



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIÓLOGO

---

---

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y  
CÁNCER

LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y LEUCEMIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE EXTRACTOS DE CHAYOTE (*Sechium edule*  
(Jacq.) Swartz) SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y CITOTÓXICIDAD EN LAS  
LÍNEAS CELULARES TUMORALES L929 Y HeLa.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
NORMA ANGÉLICA SOSA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

MÉXICO, D. F.

2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación, se realizó en el Laboratorio de Hematopoyesis y Leucemia de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM; bajo la dirección del Dr. Edelmiro Santiago Osorio a quien le agradezco por haberme acogido en su grupo de trabajo y sobretodo por el apoyo, la confianza y paciencia.

A los Doctores Jorge Cadena Iñiguez y Marcos Soto Hernández, a la Dra. Lucero del Mar Ruiz Posadas y a la Biól. Ma. Elena Monroy Vázquez. A todos, un agradecimiento en nombre del grupo de trabajo encabezado por el Dr. Edelmiro Santiago Osorio por la obtención y proporción de los extractos a estudiar y sobre todo por hacernos partícipes de este proyecto.

Al M. en C. Luís Sánchez Sánchez y a su equipo de trabajo por la donación de las líneas celulares empleadas en éste estudio y por todo el apoyo que me brindaron.

Al Dr. Isaías H. Salgado Ugarte por su asesoría para realizar el análisis estadístico de los resultados de este proyecto.

A los Miembros del Jurado: Dr. Edelmiro Santiago Osorio, M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, M. en C. Luis Sánchez Sánchez, M. en C. Hugo López Muñoz y Biól. J. M. Vicente Hernández Vázquez. A todos, un agradecimiento especial por las sugerencias realizadas a este trabajo las cuales ayudaron a enriquecer el mismo.

A las Biól. Beatriz Martínez de la Cruz, Guadalupe R. Fajardo Orduña, Ma. del Carmen Lagunas Cruz y a la estudiante de QFB Daniela Gaona Huerta. A todas ustedes por su participación de alguna manera en este proyecto y por todas las atenciones que tuvieron conmigo.

Al resto de los integrantes del laboratorio de hematopoyesis y leucemia y de la UIDCC; en especial al Biol. E. Oswaldo Silvestre Santana y a los M. en C. Hugo López Muñoz, Vicente Hernández Vázquez, Arturo Valle Mendiola y Vaniamin Domínguez Meléndez. A todos ustedes gracias por todas las enseñanzas, el apoyo y por todas las atenciones.

Finalmente, mis más sinceros agradecimientos a las familias Sosa Hernández y Muñoz Gómez por todo su apoyo.

## ABREVIATURAS

Ác.	Ácido
Ca	Calcio
CasKi	Línea celular tumoral proveniente de carcinoma de cérvix
CO <sub>2</sub>	Bióxido de Carbono
DNA	(del inglés, Desoxirribonucleic Acid)
EDTA	(del inglés, Ethylenediaminetetraacetic Acid)
Fe	Hierro
Fig.	Figura
g	gramos
h	hora
HeLa	Línea celular tumoral proveniente de carcinoma de cérvix
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición al 50%
CC <sub>50</sub>	Concentración de citotóxicidad al 50%
IC <sub>50</sub> M	Concentración de inhibición al 50% para el extracto metanólico
CC <sub>50</sub> M	Concentración de citotóxicidad para el extracto metanólico
IC <sub>50</sub> E	Concentración de inhibición al 50% para el extracto etanólico
CC <sub>50</sub> E	Concentración de citotóxicidad para el extracto etanólico
IMDM	(del inglés, Iscove's Modified Dulbecco's Médium)
IQ	2-Amino-3-methyl-imidazo(4,5-f)quinoline
KCl	Cloruro de potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato diácido de potasio
l	Litro
L929	Línea celular tumoral proveniente de fibrosarcoma de pulmón de ratón
LDH	(del inglés, Lactate Dehydrogenase)
mg	miligramos
min.	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar

N	Normal
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato monoácido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	nanómetros
P	Fósforo
PBS	(del inglés, Phostafes Buffer Saline Solution)
pH	potencial de hidrógeno
P388	Línea celular tumoral leucémica macrofágica de ratón
rpm	revoluciones por minuto
SDE	Solución Diluyente a base de Etanol
SDM	Solución Diluyente a base de Metanol
SDP	Solución Diluyente a base de PBS
<i>S.edule</i>	<i>Sechium edule</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
Sw.	Swartz
Tris	(del inglés, trishydroxymethylaminomethane)
μl	microlitos
μm	micras
v/v	volumen/volumen
var.	variedad
99mTc	Tecnecio-99m
99mTcO <sub>4</sub> Na	Pertecnetato sódico

# ÍNDICE

<b>Contenidos</b>	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>47</b>

## Tablas

<b>Tabla 1. Drogas anticancerígenas en uso clínico derivadas de plantas.....</b>	<b>3</b>
<b>Tabla 2. Componentes químicos de frutos, tallos y raíces de <i>S. edule</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>Tabla 3. Contenido relativo de cucurbitacinas en frutos de <i>S. edule</i>.....</b>	<b>12</b>

## Figuras

<b>Fig. 1. Características de una célula maligna.....</b>	<b>6</b>
<b>Fig. 2. Etapas del proceso de carcinogénesis.....</b>	<b>6</b>
<b>Fig. 3. Planta de chayote y frutos de las variedades botánicas de chayote .....</b>	<b>9</b>
<b>Fig. 4. Efecto de las soluciones diluyentes sobre la proliferación de L929.....</b>	<b>25</b>
<b>Fig. 5. Efecto de los extractos sobre el número celular y la morfología de L929 y HeLa.....</b>	<b>27</b>
<b>Fig. 6. Efecto de los extractos sobre la proliferación de L929 y HeLa.....</b>	<b>29</b>
<b>Fig. 7. Efecto citotóxico de los extractos sobre la proliferación de L929 y HeLa.....</b>	<b>32</b>
<b>Fig. 8. Efecto citotóxico de las IC<sub>50</sub> y de las CC<sub>50</sub> de extractos en L929 y HeLa.....</b>	<b>34</b>

**RESUMEN**

Las plantas son empleadas como fuente de agentes medicinales para el tratamiento de cáncer. En este contexto, se desconoce si el chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) (Cucurbitaceae) presenta propiedades anticancerígenas. Los antecedentes muestran para extractos acuosos y metanólicos, propiedades antimutagénicas, antioxidantes y anti-inflamatorias, sin embargo; se desconoce si estos ejercen alguna propiedad antiproliferativa, además; se desconoce si los tres extractos muestran efectos citotóxicos. En éste sentido, se realizaron ensayos dosis-respuesta con células tumorales L929 (fibrosarcoma de ratón) y HeLa (carcinoma de cérvix humano), estimuladas con cada uno de los extractos. Además, células no tratadas o tratadas con Tritón X-100 fueron cultivadas como controles positivos para la citotoxicidad. Después de 72 h de cultivo, se evaluó la proliferación y citotoxicidad celular mediante las técnicas cristal violeta y detección de LDH. Los extractos metanólicos y etanólicos inhiben la proliferación, tanto en L929 como en HeLa, no así para células tratadas con extracto acuoso. La inhibición de la proliferación celular es inversamente proporcional con un efecto citotóxico en ambos tipos celulares. Lo anterior, es de gran importancia ya que estas actividades biológicas mostradas para los extractos de chayote se han propuesto como mecanismos por los cuales se puede prevenir el cáncer. Extractos metanólicos y etanólicos de chayote inhiben la proliferación de células tumorales L929 y HeLa, a través de su efecto citotóxico. Lo anterior nos invita a seguir estudiando al chayote para encontrar la o las moléculas responsables de esta actividad.



## MARCO TEÓRICO

Por siglos, el hombre ha dependido de los productos naturales como fuente para la obtención de agentes medicinales; la mayoría de los cuales, fueron obtenidos de plantas. Hoy en día, alrededor del 80% de la población mundial depende predominantemente de éstas para el cuidado de su salud (Setzer y Setzer, 2003).

De las plantas, se han aislado y caracterizado compuestos activos que son usados directamente o modificados en forma sintética para ejercer su bioactividad farmacológica óptima (Balunas et al., 2005 y Setzer y Setzer, 2003).

El descubrimiento de agentes medicinales a partir de plantas ha jugado un papel importante en el tratamiento del cáncer; de hecho, la mayoría de nuevas aplicaciones clínicas de metabolitos secundarios y sus derivados han sido dirigidas hacia el tratamiento y/o prevención de esta enfermedad, siendo significativo que de los 141 medicamentos contra el cáncer que existen en el mercado de Estados Unidos, aproximadamente el 67% de estos son derivados en una u otra forma de fuentes naturales, incluyendo plantas (Balunas et al., 2005 y Vega et al., 2006).

Dentro del grupo de drogas anticancerígenas derivadas de plantas actualmente en uso clínico, se encuentran seis principales clases de compuestos (incluyendo sus derivados sintéticos y semi-sintéticos): Alcaloides vinca, epipodofillotoxinas, taxanos, camptotecinas, homoharringtoninas y elipticinas (Tabla 1) (Balunas et al., 2005, Vega et al., 2006 y Cragg y Newman 2005); sin embargo, en términos de quimioterapia, algunos de éstos presentan ciertas limitaciones como la toxicidad debido a la pérdida de especificidad de ingredientes activos y el desarrollo de resistencia a estos químicos en células cancerígenas, problema que surge después de algún tiempo de exposición a la droga, por lo que sigue vigente la necesidad de encontrar y desarrollar nuevas drogas que sean seguras, económicas y específicas (Setzer y Setzer, 2003 y Srivastava et al., 2005).

<b>Grupo</b>	<b>Droga anticancerígena</b>	<b>Fuente</b>	<b>Compuesto anticancerígeno</b>	<b>Tipo de cáncer</b>
Alcaloides Vinca	Vincristina Vinblastina Vinorelbina Vindesina	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. (Apocynaceae)	Alcaloides	Leucemias linfomas, testículo, mama, pulmón y sarcoma de Kaposi
Epipodofillotoxinas	Etopósido Tenipósido	<i>Podophyllum peltatum</i> (L.) <i>Podophyllum emodi</i> Wallich (Berberidaceae)	Alcaloides	Testículo linfomas y bronquios
Taxanos	Paclitaxel Docetaxel	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt. (Taxaceae)	Diterpeno	Ovario, mama, células no pequeñas de pulmón y sarcoma de Kaposi
Camptotecinas	Topotecan Irinotecan	<i>Camptotheca</i> <i>acuminata</i> Decne. (Nyssaceae)	Alcaloides	Ovario, colorectal y células pequeñas de pulmón
Homoharringtoninas	Homoharringtonina Harringtonina	<i>Cephalotaxus</i> <i>harringtonia</i> var. <i>drupacea</i> (Sieb y Zucc.) <i>Cephalotaxus</i> <i>hainanensis</i> (Cephalotaxaceae)	Alcaloides	Leucemia mieloide aguda y crónica
Elípticas	Elíptinina	<i>Bleekeria vitensis</i> A.C. Sm. (Apocynaceae)	Alcaloides	Mama

Tabla 1. Drogas anticancerígenas en uso clínico derivadas de plantas. Tomado de Balunas et al., 2005, Vega et al., 2006 y Cragg y Newman 2005.

Lo anterior, de lograrse es por demás interesante, pues el cáncer mundialmente es un problema de salud pública creciente que afecta a personas de todas las edades, siendo la segunda causa de muerte entre la población mundial después de enfermedades cardiovasculares; de ahí que, desde 1990 se ha reportado un incremento en incidencia del 22% en los cuatro cánceres mas frecuentes: pulmón, mama, colorectal y estomago; por lo que, para el año 2000 se presentaron alrededor de 10 millones de nuevos casos de cáncer y 6 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad (Balunas et al., 2005, Balunas et al., 2006 y Srivastava et al., 2005).

En México en el año 2006 el cáncer representó la tercera causa de muerte con 63,888 casos después de diabetes mellitus y enfermedades del corazón con 64,821 y 81,252 casos respectivamente (Boletín de estadísticas vitales INEGI, 2006).

Los factores responsables para desarrollar cáncer están clasificados como exógenos y endógenos. El primer grupo incluye hábitos nutricionales, posición socio-económica, estilo de vida, agentes físicos (radiación), compuestos químicos (naturales y sintéticos) y agentes biológicos (*Helicobacter pylori*, virus Epstein Barr, virus I y II linfotrópicos T humanos, virus del papiloma humano y el virus de la hepatitis B, parásitos tales como *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis* y *Opisthorchis vivarium*). Los factores endógenos incluyen daño del sistema inmune e inflamación (colitis ulcerativa, pancreatitis, etc), predisposición genética, edad, balance endocrino y condiciones fisiológicas (Gutiérrez y Salsamendi, 2001 y Oliveira et al., 2007).

En todos los casos, el cáncer deriva de tumores malignos que se clasifican de acuerdo al tipo de tejido donde progresen, siendo sarcomas para el tejido conjuntivo y el muscular, leucemias para el tejido hematopoyetico y linfoide y carcinomas para el tejido epitelial, algunos ejemplos de tumores malignos son fibrosarcoma de pulmón, leucemias y carcinoma de cérvix (Pardo, 1998).

Los tumores malignos se caracterizan por la presencia de células que pierden respuesta a los mecanismos de control (por ejemplo, evasión de apoptosis; lo cual, les confiere inmortalidad) y tienen una capacidad de proliferación continua con pérdida de diferenciación celular; además de la generación de su propio sistema de soporte en angiogénesis y las propiedades de invadir tejidos adyacentes y hacer metástasis de tejidos y órganos que no están relacionados con la neoplasia primaria (Fig. 1) (Trosko, 2003 y Oliveira et al., 2007).

La carcinogénesis o formación del cáncer es un proceso complejo en el cual una célula normal es transformada en una célula neoplásica. La transformación neoplásica involucra tres etapas: Iniciación, promoción y progresión. La iniciación ocurre cuando los genes de una célula normal son alterados a través de mecanismos genéticos y/o epigénéticos por varios factores; entre ellos, la exposición a agentes cancerígenos, la acumulación de errores espontáneos productos de cada división celular que constituyen un factor intrínseco de riesgo y excesos de los radicales libres que son productos normales del metabolismo celular que pueden acarrear efectos genotóxicos. Una vez que la célula ha sufrido alteraciones genéticas, se pueden activar o no los eventos destinados a preservar la normalidad celular; entre ellos, a) la acción de los mecanismos reparadores que son productos de genes que cesan los errores genéticos y los reparan para que no sean heredados por las células hijas y b) permitir que se produzca la apoptosis o muerte celular programada que excluirá a las células que acumularon muchas mutaciones. La falla de estos mecanismos, induce a la célula a que entre a la fase de promoción cargada de defectos genéticos. En la etapa de promoción, aumentan las alteraciones en la expresión de genes y causan cambios en el control de crecimiento celular, confiriendo proliferación anormal a células iniciadoras y con ello el desarrollo de células pre-neoplásicas por carencia de agentes supresores presentes en células normales adyacentes. Al igual que en la iniciación, en esta etapa la apoptosis puede actuar como mecanismo para evitar la duplicación de células con alteraciones genéticas. La inestabilidad entre el crecimiento y la muerte celular pueden llevar a la aparición de una neoplasia maligna. Finalmente en la progresión, un fenotipo neoplásico es adquirido a través de mecanismos genéticos y/o epigénéticos adicionales que dan a las células mayor ventaja selectiva de crecimiento, que permite la ocurrencia de crecimiento tisular con la formación del tumor; desencadenándose la invasión de tejidos vecinos y metástasis (Fig. 2) (Trosko, 2003 y Oliveira et al., 2007).

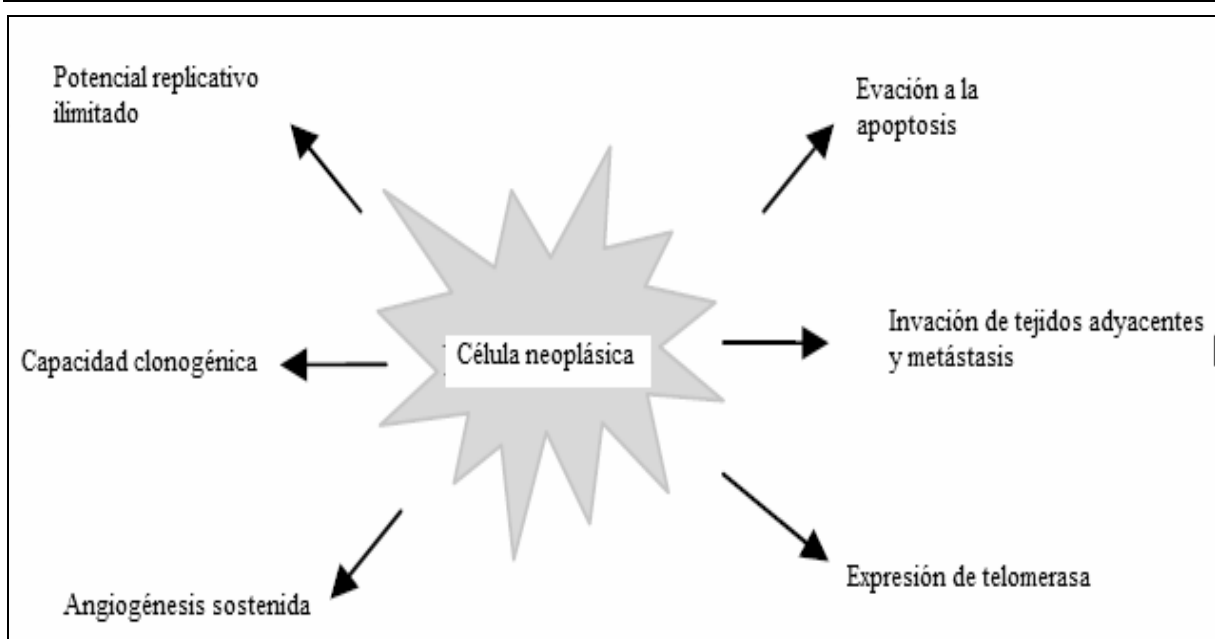


Fig. 1. Características de una célula maligna. Tomado y modificado de Oliveira et al., 2007.

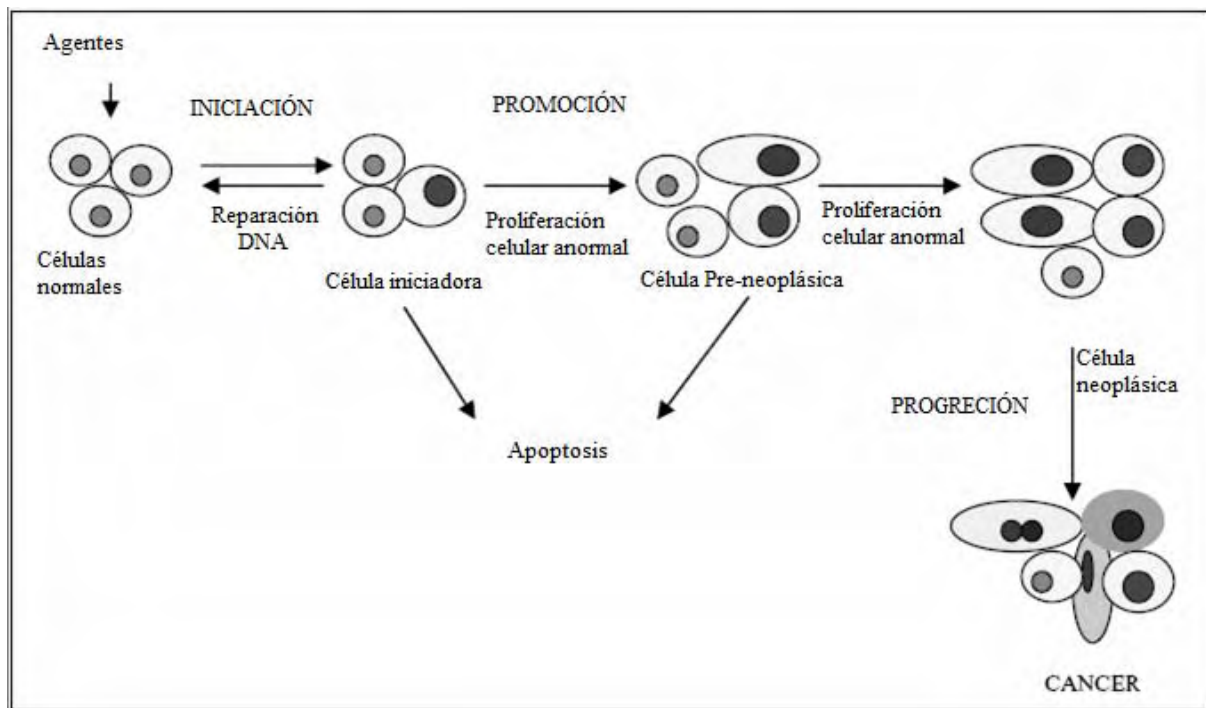


Fig. 2. Etapas del proceso de carcinogénesis. Tomado y modificado de Oliveira et al., 2007.

Actualmente, existen mecanismos de quimiopreención de la carcinogénesis que implican estrategias anti-iniciación (reparación de DNA, inhibición, detoxificación), anti-promoción (mecanismos antioxidantes, actividad anti-inflamatoria) y anti-progresión (inhibición de la proliferación celular, inducción a la diferenciación celular, inducción de apoptosis, anti-angiogénesis) (Trosko, 2003).

En este sentido, algunos reportes sugieren que las plantas comestibles podrían actuar potencialmente en la quimiopreención del cáncer, debido a su gran historia de consumo humano (Balunas et al., 2005). Además, recientemente evidencia epidemiológica sugiere fuertemente que el consumo de estos mismos productos pueden reducir el riesgo de cáncer a través de distintos mecanismos de acción (Liu, 2004).

Lo anterior representa el material inicial que puede conducir al descubrimiento de nuevos compuestos con actividad potencial anticancerosa, si se toma en cuenta que aproximadamente el 58% de especies de plantas empleadas en la etnomedicina no se han examinado con respecto a su composición química o actividad biológica (Vega et al., 2006).

Dentro de este último grupo se encuentra la especie *Sechium edule* (Jacq.) Sw., miembro de la familia Cucurbitaceae. *S. edule*, llamado comúnmente chayote, es originaria de Mesoamérica donde se encuentra la mayor diversidad genética, especialmente en México; pero se cultiva de manera rústica en muchas regiones del mundo.

La especie *S. edule* es una planta herbácea y trepadora que presentan amplia variación morfológica, la cual abarca frutos carnosos de diversas formas y dimensiones (péndulo, globosos, obovoides, piriformes, oblongos, etc.) con un número variable de depresiones longitudinales, colores de epidermis (blanco, verde claro u oscuro y brillante, amarillento, etc.), grados de espinosidad (inermes a densamente espinosos), sabor (amargo, ligeramente amargo y dulce) y polimorfismo en hojas y flores (Fig. 3) (Cadena et al., 2007 y Lira, 1999).

En nuestro país, el chayote es importante debido a sus múltiples usos y beneficios que proporciona. En términos de beneficios están los de índole preponderantemente económica, ya que el chayote se cultiva comercialmente a gran escala tanto nacional como internacional; siendo México el principal país productor de esta especie. La preferencia en los mercados de Norteamérica, ubican al chayote en la cuarta posición después del aguacate, jitomate y café (Cadena et al., 2007).

Entre sus usos más sobresalientes están el alimenticio y medicinal. Los frutos, hojas tiernas y raíces tuberosas de *S. edule* han sido y siguen siendo parte importante de la alimentación de los habitantes de América y de muchas otras partes del mundo ya que son consumidos como verdura; sin embargo, el consumo del fruto es el más difundido. También se utilizan en la industria para la elaboración de alimentos infantiles, jugos, salsas y pastas. Los tallos, duros y fibrosos, son la única parte de la planta que no se consume y se destinan a la fabricación artesanal de cestas y sombreros (Alvarenga et al., 2007 y Cadena et al., 2007). Las partes comestibles de *S. edule* (Tabla 2) son relativamente bajas en fibra, proteínas y vitaminas comparadas con otros vegetales; sin embargo, éstas tienen alto contenido de calorías y carbohidratos, especialmente en tallos jóvenes, raíces y semillas y el contenido de micro y macro-nutrientes del fruto es el adecuado. Los frutos y las semillas especialmente, son ricas en varios aminoácidos importantes tales como, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, metionina (solo en la fruta), prolina, serina, tirosina, treonina y valina. Algunas de estas características hacen al chayote particularmente apropiado para la dieta en hospitales (Lira, 1996 y Salama et al., 1986).

En cuanto al uso medicinal tradicional reportado para *S. edule*, se tiene que el té de hojas o frutos presenta efectos diuréticos, destruye cálculos renales y se utiliza como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión (Abdelnour, et al., 2002). También se ha reportado el uso de chayote en la inflamación intestinal e inflamación cutánea y en la cauterización de úlceras (Dire et al., 2003a). Las propiedades diuréticas de las semillas y las propiedades cardiovasculares y anti-inflamatorias de las hojas y frutos, han sido confirmadas por estudios farmacológicos (Lira, 1996).

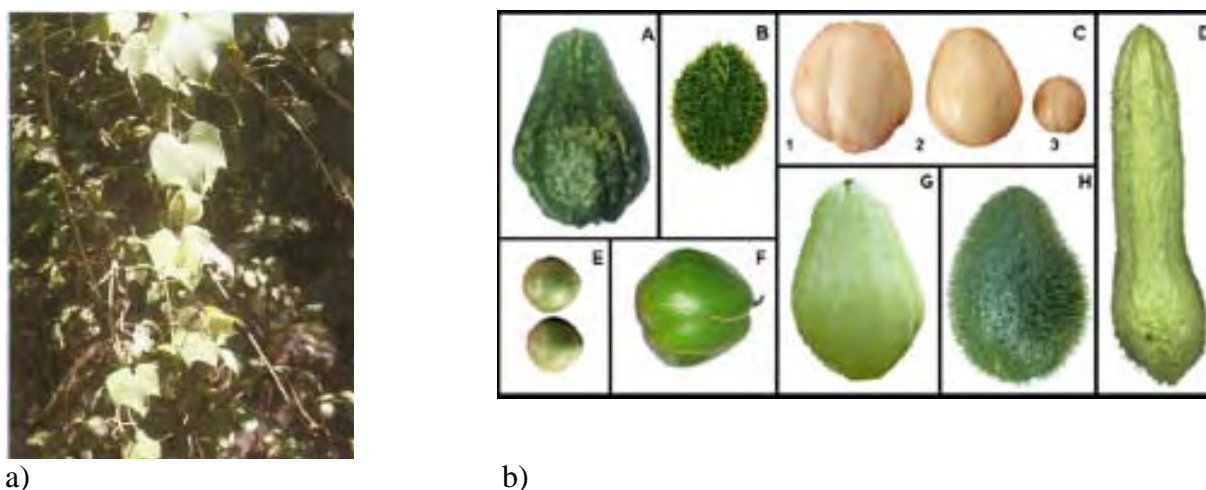


Fig. 3. *Sechium edule* (Jacq.) Sw. a) Planta de Chayote, b) Frutos de las variedades botánicas de chayote: *nigrum xalapensis* (A), *amarus silvestrys* (B), *albus levis* (C1), *albus dulcis* (C2), *albus minor* (C3), *nigrum maxima* (D), *nigrum minor* (E), *nigrum levis* (F), *virens levis* (G), *nigrum spinosum* (H) (Lira, 1999 y Cadena et al., 2007).

Componente	Fruto	Semilla	Tallo	Raíz
Calorías	26.0-31.0	–	60.0	79.0
Humedad (%)	89.0-93.4	–	89.7	79.7
Azúcares solubles	3.3	4.2	0.3	0.6
Almidón (%)	0.2	1.9	0.7	13.6
Proteínas (%)	0.9-1.1	5.5	4.0	2.0
Lípidos (%)	0.1-0.3	–	0.4	0.2
Carbohidratos %	3.5-7.7	60.0	4.7	17.8
Fibra (%)	0.4-1.0	–	1.2	0.4
Cenizas (%)	0.4-0.6	–	1.2	1.0
Ca (mg)	12.0-19.0	–	58.0	7.0
P (mg)	4.0-30.0	–	108.0	34.0
Fe (mg)	0.2-0.6	–	2.5	0.8
Vitamina A (mg)	5.0	–	615.0	–
Tiamina (mg)	0.03	–	0.08	0.05
Riboflavina (mg)	0.04	–	0.18	0.03
Niacina (mg)	0.4-0.5	–	1.1	0.9

Tabla 2. Componentes químicos (% o mg/100 g) de frutos, tallos jóvenes y raíces de *S. edule*. Tomado y modificado de Lira, 1996.



En este contexto, como un intento de explicar algunos efectos medicinales de *S. edule* recientemente se han realizado estudios farmacológicos a partir de extractos obtenidos con el uso de disolventes como agua, metanol y etanol.

En 2001, Yen y colaboradores mostraron que extractos acuosos de hojas y tallos de chayote tienen potencial antimutagénico sobre el mutágeno indirecto 2-Amino-3-methyl-imidazo(4,5-f) quinoline (IQ), en un sistema bacterial (cepas de *Salmonella thiphimurium*) con una IC<sub>50</sub> menor a 1 mg/placa; además, fracciones del mismo extracto mostraron actividad peroxidasa y compuestos fenólicos, ambos antioxidantes. Los antioxidantes han sido considerados como una terapia promisorio para la prevención y tratamientos de enfermedades como el cáncer pues previenen los altos niveles de oxidantes que ocasionan daño celular y que promueven actividad cancerígena (Seifried et al., 2007).

No obstante al estudio anterior, también se ha reportado para extractos acuosos de chayote su capacidad de alterar el marcaje de elementos sanguíneos con el radionúclido tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc); así como también, de alterar la morfología de eritrocitos, la fijación de radioactividad en las proteínas sanguíneas y la biodistribución del radiofarmacéutico pertecnetato sódico (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>Na). Además, también se mostró que estos extractos inducen lesiones en la molécula de DNA, reducen los niveles de glucosa, globulina y de la presión sanguínea diastólica. En suma, se sugiere que los efectos biológicos mostrados se deben a que el chayote presenta algunos compuestos con propiedades oxidantes y a la generación de metabolitos activos *in vivo* (Diré et al., 2001, 2002, 2003a y b y 2004).

En cuanto a la actividad de extractos metanólicos, Salama y colaboradores mostraron que tanto extractos de frutos de chayote y sus fracciones etéreas y metanólicas; así como, una sustancia glicosídica y su aglicón aisladas a partir de los extractos metanólicos crudos, tienen actividades cardiacas y anti-inflamatorias (Salama et al., 1986 y 1987), mecanismo propuesto por el cual fitoquímicos de la dieta pueden prevenir el cáncer (Liu, 2004). Además, previamente el mismo grupo de trabajo mostró en un análisis fitoquímico del fruto de *S. edule* la presencia de alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides y/o triterpenos. Los resultados de este trabajo, confirman el hecho de que los esteroides y/o triterpenos son compuestos característicos de la familia Cucurbitaceae, a la cual pertenece *S. edule* (Salama, 1986), compuestos que de manera interesante se han mostrado promisorios como agentes antineoplásicos; entre ellos, las cucurbitacinas ya que han demostrado actividad antiproliferativa y citotóxica sobre varias líneas celulares cancerígenas (Setzer y Setzer,

2003). En tanto las propiedades de saponinas, algunos estudios previos revelaron que estos compuestos muestran varias actividades fisiológicas y farmacológicas, tales como; actividades anti-cancer, anti-inflamatorias, cardiovasculares y citotóxicas (Seong et al., 2007).

Por otro lado, Huang y colaboradores en 2004, mostraron que dichos extractos obtenidos a partir de tallos presentan propiedades antioxidantes las cuales son asociadas con un bajo riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer; además, también mostraron que el contenido fenólico fue significativamente correlacionado con su propiedad antioxidante, sugiriendo a los compuestos fenólicos como responsables parcialmente de esta actividad biológica; mientras que, en otras investigaciones a partir de extractos metanólicos obtenidos de hojas, raíces, tallos y frutos se detectaron, caracterizaron y cuantificaron flavonoides; los cuales, son conocidos por tener actividades farmacológicas, particularmente propiedades antioxidantes y efectos anticancerígenos (Siciliano et al., 2004).

Finalmente, algunas investigaciones han mostrado que extractos etanólicos a partir de semillas, tallos, hojas y pétalos de 127 plantas que corresponden a 42 familias diferentes, entre ellas, a la familia Cucurbitaceae a la cual pertenece *S. edule*, han mostrado la presencia de compuestos polifenólicos y sustancias no fenólicas como terpenos bioactivos y alcaloides (The Local Food-Nutraceuticals Consortium, 2005); los cuales, han sido reportado ampliamente en la literatura como compuestos con actividades antineoplásicas (Véga et al., 2006). Además, Cadena y colaboradores en 2007; mostraron en análisis químico de extractos etanólicos de frutos de chayote de todas las variedades botánicas la presencia de cucurbitacinas (compuestos terpenoides) (Tabla 3), las cuales; se sabe exhiben un amplio rango de actividad biológica siendo reconocidas principalmente como los principios tóxicos de la familia Cucurbitaceae. (Jayaprakasan et al., 2003 y Setzer y Setzer, 2003). Aunado a lo anterior, nuestro grupo de trabajo mostró que extractos etanólicos obtenidos de las ocho variedades de chayote (Fig. 3), tienen efecto antiproliferativo sobre líneas celulares tumorales aun desde volúmenes de 0.4 µl; siendo el extracto de la var. *nigrum spinosum* el que presenta mayor efecto antiproliferativo para la línea celular tumoral de ratón L929 (fibrosarcoma de pulmón) y los extractos de la var. *virens levis* y de la var. *nigrum levis* para la línea leucémica macrofágica de ratón P-388 (Salas y Torres, 2007). Lo anterior es de gran importancia ya que, la actividad antiproliferativa es una propiedad básica de agentes antineoplásicos (Setzer y Setzer, 2003).

---

<b>Variedades botánicas</b>	<b>Cucurbitacinas</b>
	<b>g·100 g<sup>-1</sup></b>
<i>virens levis</i>	0.0116
<i>nigrum xalapensis</i>	0.0195
<i>nigrum spinosum</i>	0.0190
<i>nigrum levis</i>	0.0660
<i>amarus silvestrys</i>	0.1456
<i>albus minor</i>	0.0039
<i>albus dulcis</i>	0.0027
<i>albus levis</i>	0.0088

---

Tabla 3. Contenido relativo de cucurbitacinas en frutos de ocho variedades botánicas de *S. edule*. Tomado y modificado de Cadena et al., 2007.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A partir de diversas plantas, se han identificado y aislado compuestos con propiedades anticancerígenas como fenoles, flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides y terpenos. Interesantemente, a partir de extractos acuosos, metanólicos y etanólicos obtenidos de chayote se han identificado algunas moléculas que pertenecen a éste grupo, sin embargo; no se ha evaluado si alguno de éstos extractos tienen la propiedad de disminuir la proliferación de células tumorales.

## JUSTIFICACIÓN

En México el cáncer representa la tercer causa de muerte (Boletín de estadísticas vitales INEGI, 2006) a pesar de los avances en las estrategias terapéuticas como la cirugía, radioterapia y quimioterapia. En la mayoría de los casos, las células tumorales adquieren resistencia a los agentes antineoplásicos empleados (Setzer y Setzer, 2003 y Srivastava et al., 2005); por lo que sigue vigente la necesidad de encontrar nuevos productos con actividad antitumoral (Cragg y Newman, 2005).

En la actualidad, las plantas continúan representando el recurso natural mas explorado en la búsqueda de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides y terpenos que se sabe tienen propiedades anticancerígenas (Setzer y Setzer, 2003, Seong et al., 2007, Seifried et al., 2007 y Siliciano et al., 2004). El chayote es un producto mesoamericano de importancia alimenticia y comercial para México (Cadena et al., 2007), interesantemente se ha demostrado que extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de esta especie contienen alguna de éstas moléculas (Yen et al., 2001, Salama et al., 1986 y 1987, Huang et al., 2004, Siliciano et al., 2004 y Cadena et al., 2007), sin embargo; hasta ahora no se ha evaluado la actividad antiproliferativa de los tres extractos sobre líneas celulares tumorales.

De mostrarse que alguno de los extractos de chayote efectivamente muestran alguna actividad antiproliferativa, sería el punto de partida para proceder a fraccionarlos en busca de la o las moléculas responsable de tal actividad; con lo cual, no solo se pueda considerar al chayote como fuente alimenticia, sino también se abre la posibilidad de considerar a esta especie como un producto nutracéutico.

## HIPÓTESIS

A partir de varias especies de plantas se han aislado e identificado compuestos con propiedades anticancerígenas; como fenoles, flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides y terpenos. Por otro lado, en extractos acuosos, metanólicos y etanólicos obtenidos de chayote (*Sechium edule* (Jacq) Sw.) solo se han identificado algunas de éstos compuestos, por lo anterior, se espera que los extractos muestren efectos antiproliferativos sobre líneas celulares tumorales.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar si los extractos metanólico, etanólico y acuoso de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) ejercen un efecto antiproliferativo y citotóxico sobre las líneas celulares tumorales L929 y HeLa.

### Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de los extractos metanólico, etanólico y acuoso de chayote sobre la proliferación celular de L929 y HeLa.
- Determinar  $IC_{50}$  para cada una de las líneas celulares tumorales tratadas con los tres extractos.
- Evaluar la citotóxicidad de los extractos metanólico, etanólico y acuoso de chayote sobre las líneas celulares L929 y HeLa a través ensayos de crecimiento exponencial.
- Determinar  $CC_{50}$  para células L929 y HeLa tratadas con los extractos metanólico, etanólico y acuoso
- Evaluar a 24h y 48h la citotóxicidad de los extractos metanólico, etanólico y acuoso de chayote sobre las líneas celulares L929 y HeLa a partir de las  $IC_{50}$  y  $CC_{50}$  a través de ensayos de saturación celular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Materiales**

El medio de cultivo IMDM (del inglés, Iscove's Modified Dulbecco's Medium) fue adquirido del corporativo Invitrogen GIBCO-BRL (Grand Island, NY., USA); mientras que, el Suero Fetal Bovino (SFB) de la compañía HyClone (Utah, USA). El etanol, metanol y el ácido acético fueron adquiridos de la compañía Baker Analyzed, México. El kit para detección de la actividad de la enzima LDH (del inglés, Lactate Dehydrogenase), fue comprado del corporativo Roche Diagnostics (IN., USA). El tritón X-100 fue adquirido en la compañía Sigma Aldrich (St. Louis, Mo., USA). El glutaraldehído fue adquirido de la compañía Sigma Chemical, USA.

### **Líneas celulares**

En el presente proyecto de investigación, se emplearon las líneas celulares tumorales L929 proveniente de fibrosarcoma de pulmón de ratón, HeLa y CasKi provenientes de carcinoma de cérvix humano, las cuales; fueron donadas por el grupo de trabajo del M. en C. Luis Sánchez Sánchez del Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza, UNAM.

Las líneas celulares tumorales empleadas en este proyecto, representan algunos modelos celulares de diferentes especies; que son ampliamente utilizados en investigaciones relacionadas con el cáncer, sobre todo en estudios toxicológicos o químicos donde se buscan probar compuestos naturales o modificados, dado que; poseen características bien establecidas (Lacroix, 2008 y Masters, 2002). Lo anterior, favorece evaluar en estas líneas celulares, las actividades biológicas de nuestro interés; es decir, actividades antiproliferativas y citotóxicas de un compuesto de origen natural.



### **Cultivo celular**

Las líneas celulares tumorales se mantuvieron en medio de cultivo IMDM (Apéndice IIA) suplementado con 10 % de SFB desactivado (Apéndice IIB) en cajas petri de vidrio con capacidad de 10 ml (Pirex, USA) a 37° C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en una incubadora (Thermo Forma, USA). Para mantener el crecimiento exponencial, ambas líneas celulares fueron mantenidas como cultivos en monocapa de fibroblastos para L929 y epiteliales para HeLa y CasKi con una confluencia final de aproximadamente 70% y sembradas rutinariamente utilizando verseno para desprender las células (Apéndice IIC) cada 48 h a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células / ml (Protocolos de Cultivo Celular, ATCC y Morgan y Darling, 1993).

### **Extractos**

Para la realización de éste proyecto, se emplearon extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de chayote de la var. *nigrum spinosum*; los cuales, fueron proporcionados por el grupo de trabajo del Dr. Jorge Cadena Iñiguez del Colegio de Postgraduados de Chapingo, Montecillo, Texcoco, Edo. de México (Apéndice IA).

### **Dilución de extractos**

Se pesaron 71.2 mg de los extractos etanólico, metanólico y acuoso. Los extractos etanólico y acuoso se diluyeron en 40 µl de etanol; mientras que, el extracto metanólico en 300 µl de etanol. Las concentraciones de etanol empleadas en la dilución de los extractos, fueron resultado de pruebas de solubilidad adicionales. Posteriormente, los extractos se aforaron a 1 ml con PBS y se homogeneizaron usando un vortex (Scientific Industries, Bohemia, NY., USA). A continuación, las soluciones patrón obtenidas para cada uno de los extractos; fueron centrifugadas a 4000 rpm por 5 min. (Hermle, Labortechnik, Alemania) y al término de este periodo, los sobrenadantes fueron filtrados a través de una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.22 µm (Millipore, USA). Finalmente, a partir de los filtrados de cada solución patrón; se tomaron 200 µl y se aforaron a 600 µl con PBS para obtener diluciones de trabajo para cada uno de los extractos. Adicionalmente, se elaboraron soluciones diluyentes

(vehículos) como controles; a través del mismo procedimiento pero sin extractos. Todas las preparaciones fueron almacenadas a 8 °C hasta su uso (Salas y Torres, 2007).

### **Ensayo de proliferación celular**

Para determinar el efecto de los extractos sobre la proliferación celular tumoral,  $2 \times 10^4$  células/ml de L929 o HeLa se cultivaron por 72 h bajo las condiciones antes mencionadas; en cantidades de 200  $\mu$ l de medio, células y suero /pozo en placas de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA) con o sin diferentes volúmenes (0 (20  $\mu$ l de solución diluyente), 0.4  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ l y 20  $\mu$ l) de las diluciones de trabajo de cada uno de los extractos. El efecto de los extractos sobre la proliferación de las células tumorales L929 y HeLa fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta (Kueng, 1989 y Salas y Torres, 2007).

### **Evaluación de la proliferación celular**

La proliferación celular fue evaluada mediante la técnica cristal violeta modificada por Kueng, 1989 y originalmente propuesta por Gillies et al., 1986. Brevemente, transcurridas las 72 h de incubación las células se fijan con 50  $\mu$ l / pozo de glutaraldehído al 1% (Apéndice IVA) por 1h. Posteriormente, se desecha el glutaraldehído y se adicionan 50  $\mu$ l /pozo de la solución cristal violeta (Apéndice IVB) para teñir el DNA del núcleo de las células (Wakelin et al., 1981); lo cual, es un parámetro indirecto para cuantificar número celular (Gillies et al., 1986). Después, se agitó la placa por 10 min. en un agitador de placas (Labnet International Inc. Woodbridgr, NY., USA) y al término de este periodo, el colorante no asimilado por las células fue removido por lavados con agua destilada. Finalmente, el colorante unido a las células se solubilizó con 50  $\mu$ l / pozo de ácido acético al 10% (Apéndice IVC) y se agitó la placa por 20 min. Las densidades ópticas fueron leídas a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Tecan Spectra, Austria) y se graficaron como % de proliferación celular con respecto al control y a partir de éstas se obtienen por regresión lineal (Apéndice IVA), las concentraciones de cada uno de los extractos necesarias para reducir el 50% de la proliferación celular tumoral con respecto al control, es decir; se determinaron IC<sub>50</sub>.

### **Ensayo de citotóxicidad**

Para examinar el efecto citotóxico de los extractos de chayote hacia las líneas celulares tumorales L929 y HeLa, se realizaron ensayos de acuerdo a la metodología empleada por López y colaboradores en 2002. En estos ensayos de crecimiento exponencial, se cuantifica la citotóxicidad basada sobre la medición de la actividad de la enzima LDH (del inglés, Lactate Dehydrogenase) liberada en el medio de cultivo por células dañadas.

Para ello,  $2 \times 10^4$  células/ml de L929 o HeLa; se cultivaron por 72 h bajo las condiciones antes mencionadas; en cantidades de 200  $\mu$ l de medio, células y suero /pozo en placas de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA) con o sin diferentes volúmenes (0 (20  $\mu$ l de solución diluyente), 0.4  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ l y 20  $\mu$ l)) de las diluciones de trabajo de cada uno de los extractos. Adicionalmente, se incluyeron cultivos como controles positivos para la toxicidad celular absoluta con una solución de tritón X-100 al 2% con medio de cultivo al 10% de SFB, en relación 1:1 con respecto a los pozos de cultivo con células, medio y suero.

### **Evaluación de citotóxicidad**

Para evaluar la citotóxicidad, los sobrenadantes de células tratadas con cada uno de los extractos y de células tratadas con los controles negativos y positivos fueron empleados. Brevemente, los sobrenadantes se cultivaron con la solución que detecta LDH en relación 1:1 en una placa de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA) a temperatura ambiente por 30 min. La placa se protegió en todo momento de la luz para evitar cualquier interferencia hacia las reacciones enzimáticas que ocurren en este momento. Finalmente, al término del periodo de incubación la absorbancia es leída a 490 nm en un espectrofotómetro (Tecan Spectra, Austria) y a partir de ellas se obtienen las concentraciones de cada uno de los extractos necesarias para matar el 50% de las células con respecto al control negativo, es decir se determinan por regresión lineal (Apéndice VB),  $CC_{50}$ .

### Ensayo de citotoxicidad a partir de las IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de los extractos

De acuerdo a la metodología empleada por Sun y colaboradores en 2007 a partir de ensayos en confluencia,  $7.5 \times 10^4$  cel/mL de L929 y HeLa fueron cultivadas en las condiciones antes mencionadas en 200  $\mu$ l de medio, células y suero/pozo en placas de 96 pozos fondo plano (Costar, Cambridge, MA, USA). Después de 24 h y de 48 h cultivo, se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco en presencia de 8.28  $\mu$ l, 13.04  $\mu$ l, 10.29  $\mu$ l y 15.4  $\mu$ l (IC<sub>50</sub> para el extracto etanólico y metanólico, respectivamente en L929 y HeLa) y 12.47  $\mu$ l, 14.23  $\mu$ l, 13.47  $\mu$ l y 18.97  $\mu$ l (CC<sub>50</sub> para el extracto etanólico y metanólico respectivamente en L929 y HeLa). Además, también se incluyeron los controles positivos y negativos respectivos utilizados en el ensayo de citotoxicidad previo.

### Cálculo de citotoxicidad

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad por efecto de los extractos, se calcularon los valores de absorbancia promedio de cada una de las condiciones, de tal modo que; los valores resultantes fueron sustituidos en la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{Valor de control negativo}}{\text{Valor de control positivo} - \text{Valor de control negativo (tritón)}} \times 100$$

### Análisis Estadístico

En el presente estudio, todos los ensayos se realizaron por duplicado con tres repeticiones por condición. Todos los datos se presentaron como el valor medio +/- la desviación estándar de cada grupo. Para observar diferencias estadísticamente significativas entre los datos se empleó un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba *t*-student con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0.05$ ) mediante el paquete estadístico SPSS (del inglés, Statistical Package for the Social Sciences), versión 10.0 para Windows 98.

---

## RESULTADOS

### **Efecto de las soluciones diluyentes empleadas en la preparación de los extractos sobre la proliferación de líneas celulares tumorales.**

Antes de proceder a evaluar el efecto de los extractos, se consideró pertinente evaluar si por si solas; las soluciones diluyentes afectan o no la proliferación celular de nuestros modelos. Una prueba preliminar indicó que 71.2 mg de extracto etanólico y metanólico, se diluyen con 40  $\mu$ l y 300  $\mu$ l de etanol y metanol respectivamente; mismos que se aforaron a 1 mL con PBS, mientras que; 71.2 mg del extracto acuoso se diluyeron directamente en 1 ml de PBS. Las tres soluciones patrón de los extractos, fueron centrifugadas a 4000 rpm y filtradas en membranas con poros de 0.22  $\mu$ m. Del filtrado de cada solución patrón, se tomaron 200  $\mu$ l y se llevaron a un volumen de 600  $\mu$ l con PBS para tener las diluciones de trabajo para cada extracto, de las cuales se tomaron 0.2  $\mu$ l, 0.4  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, y 20  $\mu$ l para cultivarlos por 72 h en cada pozo de cultivo con 200  $\mu$ l de medio mas suero y células ( $2 \times 10^4$  células/ml de L929 o CasKi). Como control de las soluciones diluyentes (vehículo), se realizó el mismo procedimiento pero sin extracto y se adicionaron los mismos volúmenes a cada pozo conteniendo 200  $\mu$ l de medio de cultivo, suero y células. Al término del cultivo, el efecto de las soluciones diluyentes sobre el potencial proliferativo de L929 y CasKi fue evaluado mediante la técnica cristal violeta. Los resultados indican que las dosis altas (10 $\mu$ l y 20 $\mu$ l) de la solución diluyente a base de metanol (SDM), muestran toxicidad significativa ( $p < 0.05$ ) sobre la línea celular tumoral L929 con respecto al control (0 $\mu$ l) (Fig. 4), mientras que la solución diluyente a base de etanol (SDE) o solo PBS (SDP) no alteraron la proliferación celular (datos no mostrados). Interesantemente, la línea celular tumoral CasKi tratada con distintas concentraciones de SDM, SDE y SDP; mantuvo un comportamiento similar al visto en L929 (datos no mostrados).

Debido a la reducción de la proliferación mostrada por la SDM fue necesario encontrar un diluyente apropiado para el extracto metanólico. Considerando que el etanol tiene propiedades de solubilidad parecidas al metanol (Areal, 1995), se procedió a evaluar si el extracto metanólico podían diluirse en etanol. Encontramos que 300  $\mu$ l de etanol también diluyeron al extracto metanólico. Al comparar el efecto del vehículo a base de 300  $\mu$ l de etanol contra el vehículo con metanol empleando la dilución de trabajo, se encontró que solo el metanol afecta la proliferación celular (Fig. 4). Por lo anterior,

consideramos a la solución diluyente a base de etanol (SDE) ideal para la preparación de los extractos de chayote, independientemente del disolvente empleado en su obtención.

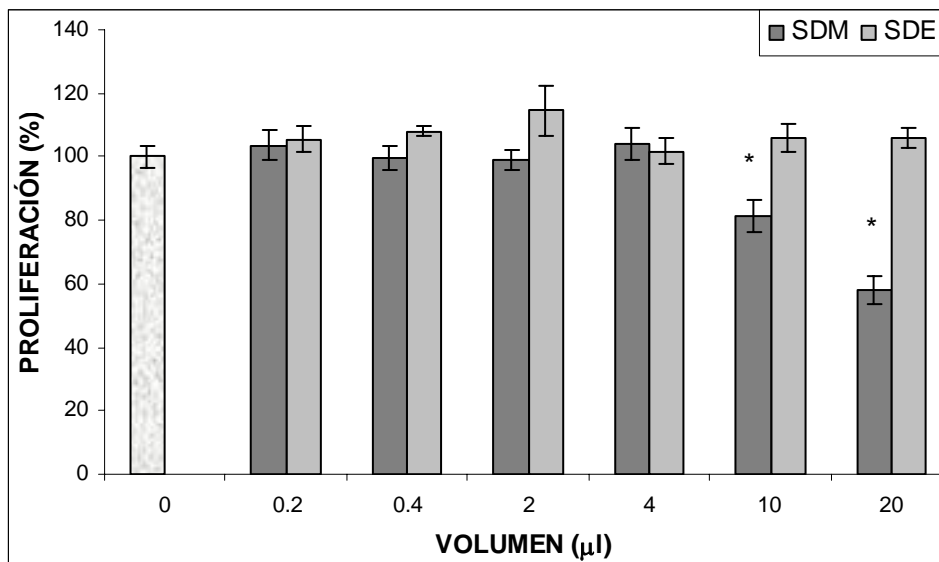


Fig. 4. Efecto de las soluciones diluyentes a base de etanol y metanol sobre la proliferación de la línea celular tumoral L929. 0 (sin diluyente). SDM, solución diluyente a base de metanol. SDE, solución diluyente a base de etanol. Volumen, µl de solución diluyente de trabajo sin extracto. \* Diferencia significativa con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

#### **Efecto de los extractos metanólico, etanólico y acuoso sobre la proliferación de las líneas celulares tumorales L929 y HeLa.**

Una vez preparados los extractos, se realizaron ensayos dosis-respuesta para determinar su efecto sobre la proliferación de líneas celulares tumorales. Para determinar lo anterior,  $2 \times 10^4$  células/ml de L929 o HeLa se cultivaron por 72 h en cantidades de 200 µl /pozo en presencia/ausencia de diferentes volúmenes (0 (20 µl de solución diluyente), 0.4 µl, 2 µl, 4 µl, 10 µl y 20 µl) de las diluciones de trabajo de cada uno de los extractos. El efecto de los extractos sobre la proliferación de las células tumorales fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta.

Al término del cultivo, se observó bajo el microscopio que los extractos metanólico y etanólico reducen el número celular tanto en L929 como en HeLa; aun desde el volumen más bajo (0.4µl) con respecto a la densidad celular mostrada en los controles (0) comportamiento que no ocurre aun con el volumen máximo (20µl) del extracto

acuoso. La reducción en el número celular con respecto a los controles, fue más evidente en células L929 y HeLa tratadas desde los volúmenes de 4  $\mu$ l. Además de la reducción en el número celular, también se observaron cambios a nivel morfológico de células tratadas con los extractos con respecto a las células de los controles; siendo más evidentes en células tratadas con la máxima concentración (20  $\mu$ l). De este modo, pocas células L929 tratadas con el extracto metanólico en volúmenes de 20  $\mu$ l, se mostraron aun con características típicas de un fibroblasto, es decir; se observaron células alargadas que se mantuvieron adheridas, sin embargo; un grupo pequeño de células perdieron ésta morfología y tendieron a ser esféricas, lo cual; es consecuencia de la pérdida de adherencia celular; en tanto que, otro grupo mayoritario se encontró en suspensión que puede ser un indicador de muerte celular. Interesantemente, la mayoría de las células L929 tratadas con el extracto etanólico en 20  $\mu$ l; se encontraron en suspensión, mientras que; dentro del grupo de células adheridas, solo se observaron algunas células alargadas y un grupo mayor de células esféricas. Por otro lado, la mayoría de las células HeLa tratadas con los extractos metanólico y etanólico (20  $\mu$ l); se observaron en suspensión, mientras que; dentro del grupo pequeño de células adheridas, aun se observaron células con morfología típica normal que tiende aun a forman agregados, sin embargo; solo en células tratadas con el extracto etanólico, se observó un pequeño número de células de tipo esféricas (Fig. 5).

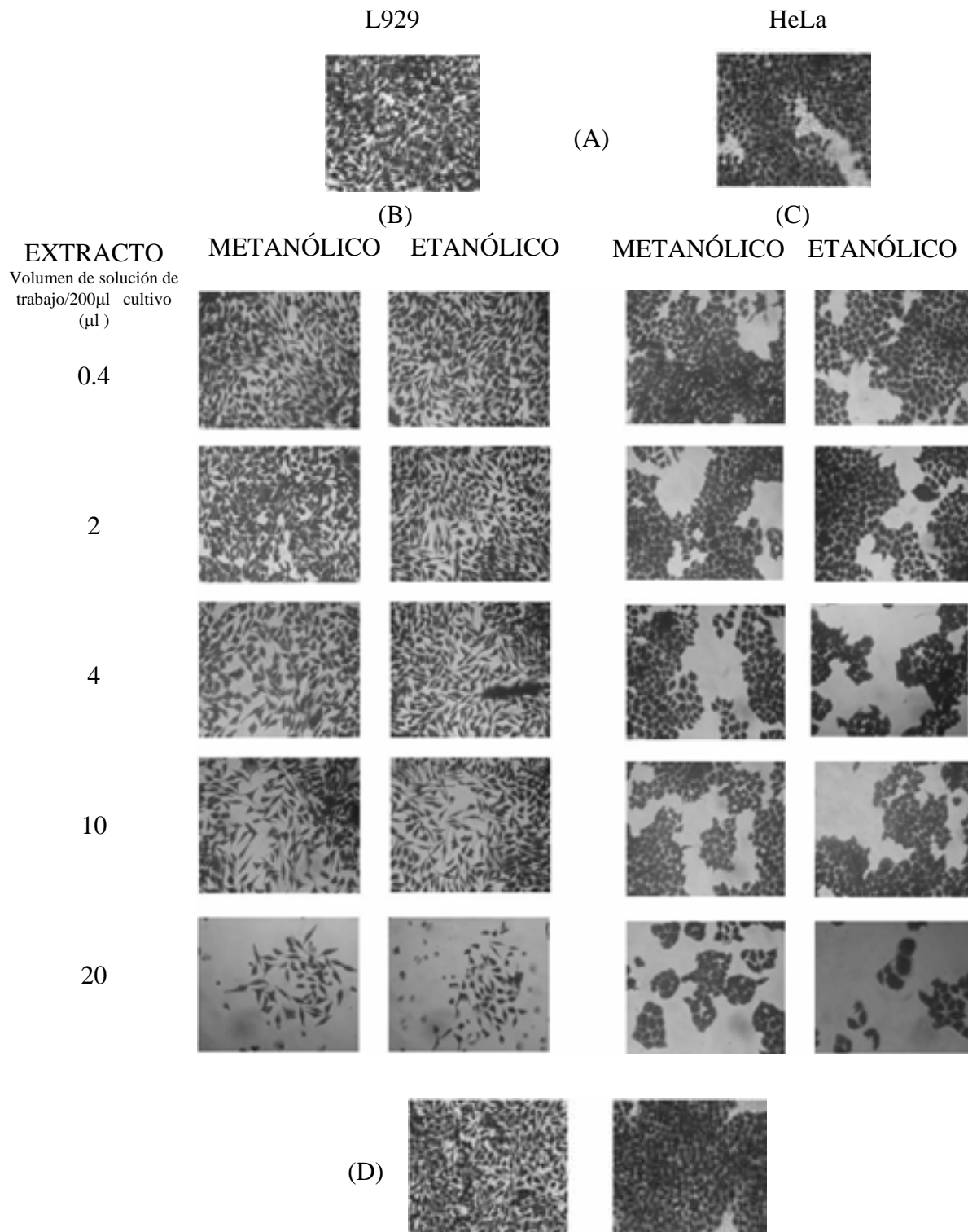


Fig. 5. Efecto de los extractos metanólico, etanólico y acuoso sobre el número celular y la morfología de las líneas celulares tumorales L929 y HeLa. (A) Células L929 y HeLa no tratadas (0 (20 µl de solución diluyente)). (B) Células L929 tratadas con extractos metanólico y etanólico. (C) Células HeLa tratadas con extractos metanólico y etanólico. (D) Células L929 y HeLa tratadas con 20µl de extracto acuoso. Fotografías de un ensayo representativo tomadas a 10 x.

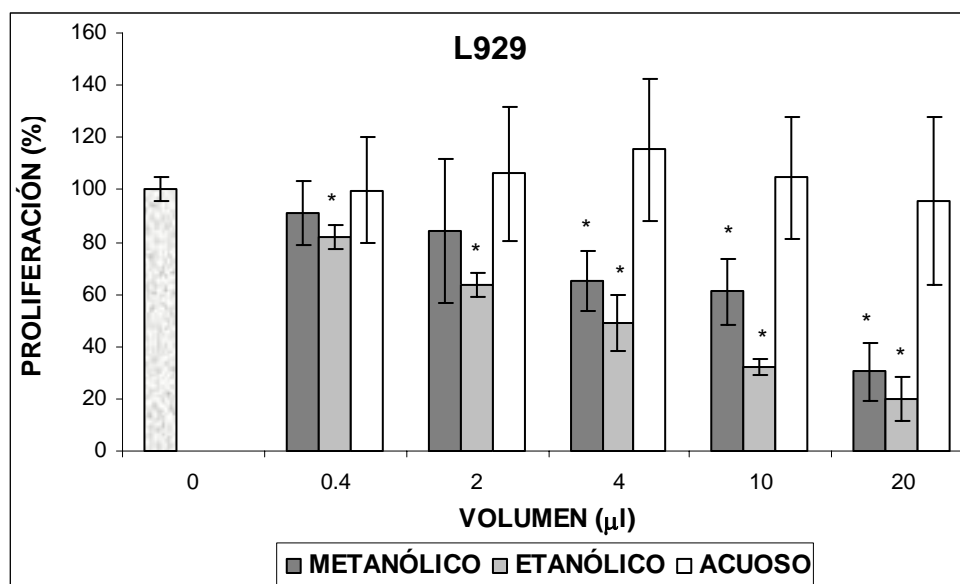


En cuanto a la evaluación de la proliferación celular por la técnica cristal violeta, los datos obtenidos indican que; células L929 tratadas con el extracto metanólico disminuyen su proliferación celular significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (0) a partir del volumen de 4  $\mu\text{l}$ , comportamiento que se potencializa en células tratadas con el extracto etanólico aun desde el volumen mínimo del 0.4  $\mu\text{l}$ ; e incluso a tal grado que, células tratadas con el máximo volumen (20  $\mu\text{l}$ ) muestran porcentajes de proliferación muy bajos (alrededor del 20%). Además, es de resaltar que con el extracto acuoso no existe efecto positivo o negativo sobre la proliferación celular con respecto al control (0) aun en las concentraciones más altas (Fig. 6A).

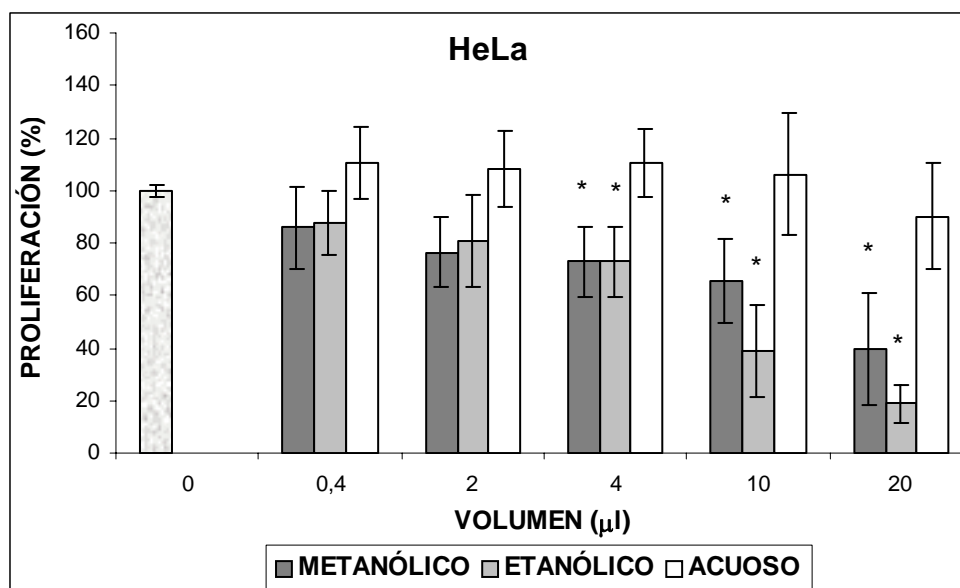
Por otro lado, células HeLa no difieren en comportamiento con respecto a lo que sucede en L929, al menos no en las tratadas con extractos metanólico y acuoso; caso contrario a lo que ocurre con células tratadas con extracto etanólico, ya que; presentan una reducción en su proliferación significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (0) a partir de la concentración de 4  $\mu\text{l}$ , 10 veces más de la requerida para reducir, en la misma proporción, la proliferación de L929 (Fig. 6B). De este modo, los porcentajes de proliferación en HeLa están por encima de los que presenta L929 sobre todo en células tratadas con extracto etanólico (Fig. 6A y 6B).

De acuerdo a los datos anteriores, se puede inferir para L929 que el extracto etanólico presenta el mayor efecto antiproliferativo con respecto al extracto metanólico, mientras que; en HeLa, los extractos etanólico y metanólico mostraron un menor efecto antiproliferativo. En ambos casos, el extracto acuoso no mostró ningún efecto. Un forma de corroborar los comportamiento anteriores, es determinando las concentraciones óptimas que reducen el 50% de la proliferación celular de un cultivo control (0). Lo anterior, se logró realizando la determinación de las  $IC_{50}$  para los extractos en cada tipo celular a través del método de cálculo por regresión lineal (Apéndice VA). Los datos muestran efectivamente que el extracto metanólico requiere volúmenes mayores (13.04  $\mu\text{l}$  y 15.41  $\mu\text{l}$ ) que el extracto etanólico (8.28  $\mu\text{l}$  y 10.29  $\mu\text{l}$ ) para reducir el 50% de la proliferación celular de un cultivo control (0%) tanto en L929 como en HeLa respectivamente, además al comparar los valores de la  $IC_{50}$  tanto del extracto metanólico como etanólico de L929 con respecto a HeLa, es evidente que para L929 se requieren concentraciones más bajas (Fig. 6C).

A)



B)



C)

LÍNEA CELULAR	L929	HeLa
EXTRACTO	IC <sub>50</sub> (µl)	
METANÓLICO	13.04	15.41
ETANÓLICO	8.28	10.29

Fig. 6. Efecto de los extractos sobre la proliferación de las líneas celulares tumorales L929 y HeLa. (A) Efecto de los extractos metanólico, etanólico y acuoso sobre la proliferación de L929. (B) Efecto de los extractos metanólico, etanólico y acuoso sobre la proliferación de HeLa. (C) IC<sub>50</sub> para los extractos metanólico y etanólico en L929 y HeLa. \* Diferencia significativa con respecto al control (0µl (20 µl de solución diluyente) (p<0.05).

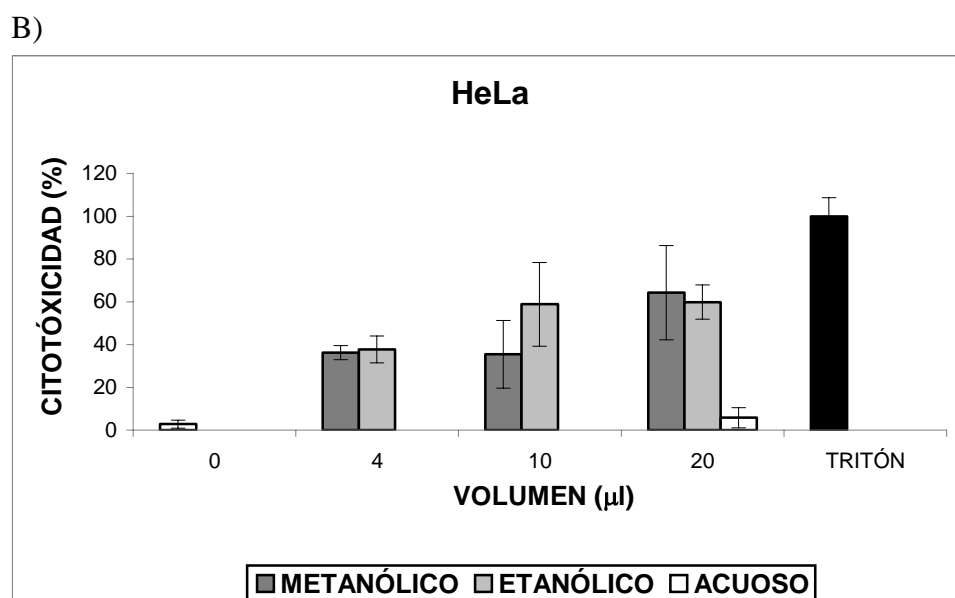
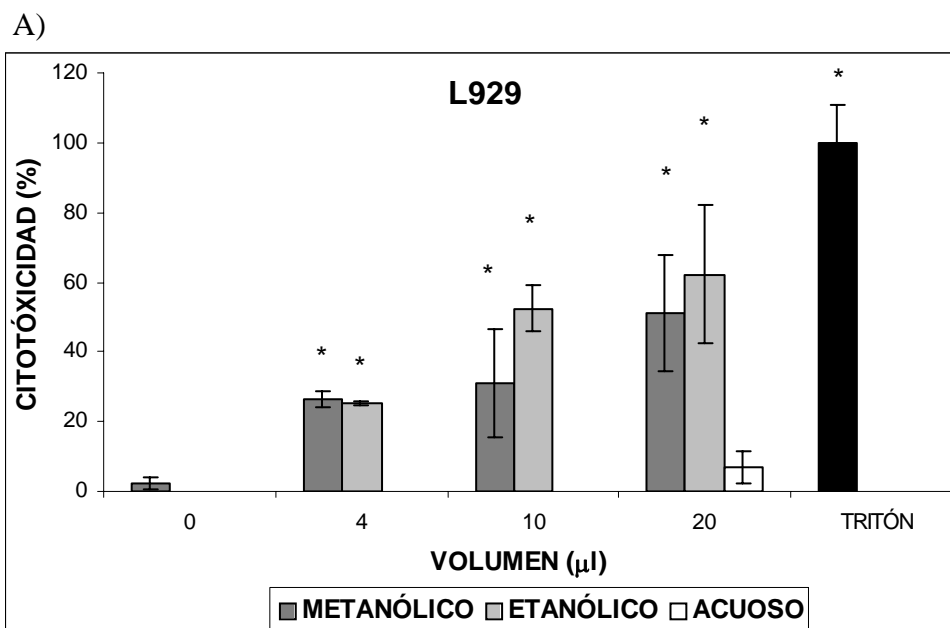
**Efecto citotóxico de los extractos metanólico, etanólico y acuoso sobre las líneas celulares L929 y HeLa.**

La disminución de la proliferación celular y los cambios morfológicos presentes en cultivos tratados con los extractos metanólico y etanólico, puede ser consecuencia de un efecto citotóxico. De acuerdo a la literatura, la citotoxicidad puede ser evaluada mediante ensayos con un número celular bajo que permita su crecimiento exponencial o a través de ensayos con densidades celulares en confluencia (López et al., 2002 y Sun et al., 2007). En este sentido, para la evaluación de la citotoxicidad en ensayos en crecimiento exponencial; los sobrenadantes de  $2 \times 10^4$  células/ml de L929 o HeLa cultivadas por 72 h en cantidades de 200  $\mu$ l /pozo con o sin diferentes concentraciones (0 20  $\mu$ l de solución diluyente), 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ l y 20  $\mu$ l) de las diluciones de trabajo de los extractos metanólico y etanólico y con 20  $\mu$ l del extracto acuoso, fueron empleados. Los volúmenes de las soluciones de trabajo empleadas en este ensayo, fueron elegidas por mostrar un efecto citotóxico representativo dentro de nuestros modelos. Adicionalmente, se incluyeron cultivos como controles positivos para la toxicidad celular al con 100  $\mu$ l de una solución de tritón X-100. El efecto citotóxico de los extractos fue evaluado mediante la detección de la enzima LDH.

Los resultados muestran para L929 y HeLa, que los extractos etanólico y metanólico en todas las concentraciones evaluadas tienen un efecto citotóxico significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al control (0), de hecho; es interesante que la citotoxicidad que presentan los volúmenes mas altos (20  $\mu$ l) sea muy cercana a las obtenidas con Tritón (control positivo para la citotoxicidad), alcanzando hasta 70% de citotoxicidad aproximadamente, sin embargo; el extracto acuoso aun en esta misma concentración, no presenta efecto citotóxico al igual que el control negativo (0) en ninguna línea celular. Además, es de resaltar que en ambos tipos celulares tratados con 4  $\mu$ l tanto del extracto metanólico como del etanólico, se mantiene un efecto citotóxico parecido, sin embargo; en HeLa el porcentaje de citotoxicidad en ambos tipos celulares alcanza aproximadamente un 40%, mientras que; para L929 es de solo el 25%. Por otro lado, tanto en L929 como en HeLa tratadas con 10  $\mu$ l del extracto metanólico y etanólico, los porcentajes de citotoxicidad son 10% mas altos en HeLa con respecto a los mostrados en L929, en tanto que; para los volúmenes de 20  $\mu$ l, el efecto citotóxico del extracto metanólico en HeLa alcanza un 60%, mientras que en L929 estimulada con la misma

concentración, el 50 %, sin embargo; el efecto citotóxico del extracto etanólico se mantiene constante en ambos tipos celulares. Finalmente, en cuanto a células tratadas con 20  $\mu\text{l}$  del extracto acuoso, es evidente que no existe efecto citotóxico significativamente diferente con respecto al control (0) (Figura 7A y 7B). No obstante a que en este ensayo no se evaluaron las concentraciones de las  $\text{IC}_{50}$  para el extracto etanólico y metanólico en L929 y HeLa que corresponden a 8.28  $\mu\text{l}$ , 13.04  $\mu\text{l}$ , 10.29  $\mu\text{l}$  y 15.41  $\mu\text{l}$  respectivamente (Fig. 6 C); todas ellas caen dentro del rango de dosis evaluadas, por lo anterior; podemos inferir que las  $\text{IC}_{50}$  para el extracto etanólico y metanólico tanto en L929 como en HeLa, muestran efecto citotóxico significativo con respecto al control (0). Sin embargo, algunos autores han propuesto la determinación de las concentraciones óptimas que matan el 50% de la viabilidad celular de un cultivo control (0), es decir;  $\text{CC}_{50}$ , lo anterior como un parámetro de medición más confiable. En este sentido, a partir de los datos previos; se calcularon  $\text{CC}_{50}$  a través del método de regresión lineal (Apéndice VB).

Los datos muestran para L929 y HeLa valores de las  $\text{CC}_{50}$  para extractos metanólico y etanólico mas altos que los valores que corresponden a las  $\text{IC}_{50}$  previamente calculadas, e interesantemente en L929 como en HeLa; se requiere de una menor concentración (8.28  $\mu\text{l}$  vs. 13.04  $\mu\text{l}$  respectivamente) del extracto etanólico para matar al 50% de la proliferación celular de un cultivo control (0), comportamiento similar a lo observado con las  $\text{IC}_{50}$ . Además, es de resaltar que las  $\text{CC}_{50}$  de L929 con respecto a las calculadas en HeLa, son menores, comportamiento ya visto en las  $\text{IC}_{50}$  (Figura 7C).



C)

LÍNEA CELULAR	L929	HeLa
EXTRACTO	IC <sub>50</sub> (µl)	
METÁNOLICO	14.23	18.97
ETÁNOLICO	12.47	13.43

Fig. 7. Efecto citotóxico de los extractos metanólico, etanólico y acuoso sobre la proliferación celular de L929 y HeLa. (A) Efecto citotóxico de los extractos sobre la proliferación de L929. (B). Efecto citotóxico de los extractos sobre la proliferación de HeLa. (C). CC<sub>50</sub> para los extractos metanólico y etanólico en L929 y HeLa. \* Diferencia significativa con respecto al control (0) (p<0.05).

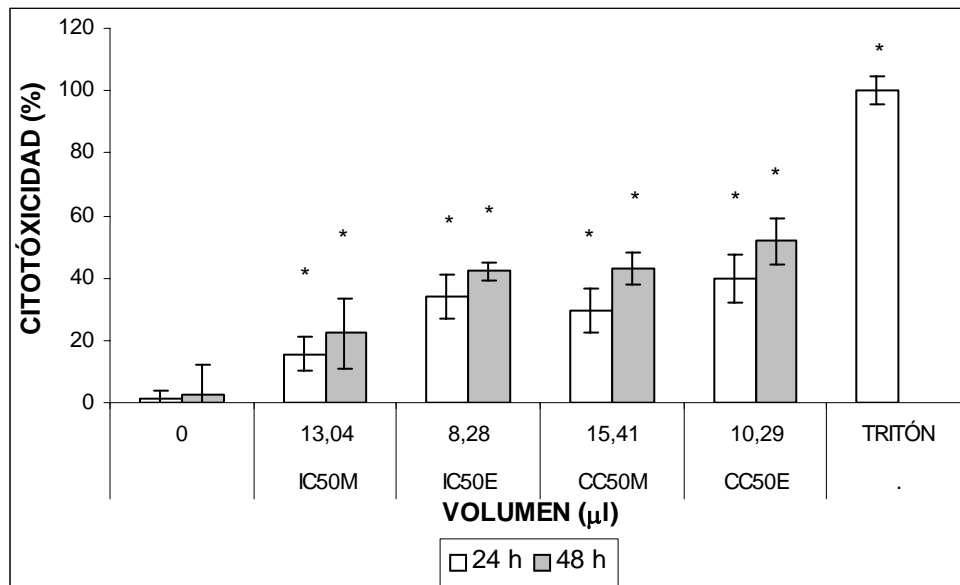
**Efecto citotóxico de las IC<sub>50</sub> y de las CC<sub>50</sub> de extractos metanólicos y etanólicos en líneas celulares L929 y HeLa.**

En trabajos previos, se han realizado diversos ensayos de citotoxicidad a partir de la IC<sub>50</sub> obtenidas de ensayos en crecimiento exponencial, sin embargo; también se ha propuesto evaluar la citotoxicidad a partir de la IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> previamente calculadas en ensayos de saturación celular.

Lo anterior se logro siguiendo la metodología reportada, es decir;  $7.5 \times 10^4$  células/mL de las línea celular tumoral L929 y HeLa fueron cultivadas por 24 h y 48 h, al termino del cultivo; se realizo en cada tipo celular el estimulo con 8.28 µl, 13.04 µl, 10.29 µl y 15.4µl (IC<sub>50</sub> para el extracto etanólico y metanólico, respectivamente en L929 y HeLa) y 12.47 µl, 14.23 µl, 13.47 µl y 18.97 µl (CC<sub>50</sub> para el extracto etanólico y metanólico respectivamente en L929 y HeLa), además se estimularon cultivos con Tritón X-100 para tener un control positivo a la muerte celular y también se consideraron cultivos sin estímulos para mantener un control negativo.

En la figura 8 se observan los resultados obtenidos para L929 y HeLa, ambos tipos celulares presentan comportamiento similares, es decir; el efecto citotóxico de las IC<sub>50</sub> y las CC<sub>50</sub> de ambos extractos, tiende a aumentar con respecto al tiempo, ya que a 24 h de cultivo se mostraron bajos porcentajes de citotoxicidad, aun en las dosis mas altas; aumentando casi al doble después de 48 h, sin embargo es de resaltar que; aun que en HeLa se emplearon dosis por encima de L929, no se observo un efecto citotóxico mas alto.

A)



B)

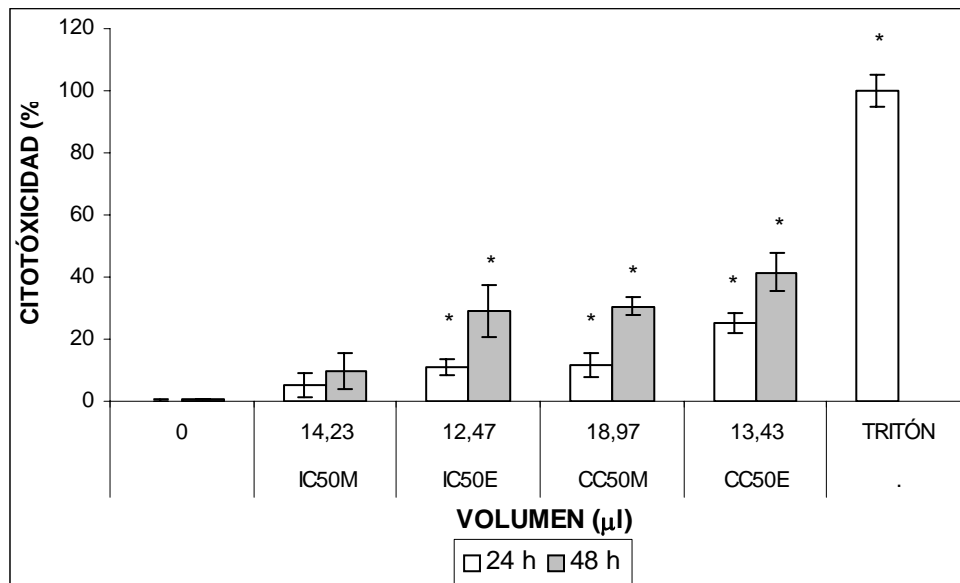


Figura 8. Efecto citotóxico de las IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de extractos metanólico y etanólico en líneas celulares L929 y HeLa. (A) Efecto citotóxico de las IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de extractos metanólico y etanólico en L929. (B) Efecto citotóxico de las IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> de extractos metanólico y etanólico en HeLa. IC<sub>50</sub>M, IC<sub>50</sub> para el extracto metanólico. IC<sub>50</sub>E, IC<sub>50</sub> para extracto etanólico. CC<sub>50</sub>M, CC<sub>50</sub> para el extracto metanólico. CC<sub>50</sub>E, CC<sub>50</sub> de citotoxicidad para el extracto etanólico. \* Diferencia significativa (p<0.05) con respecto al control (0).

---

---

## DISCUSIÓN

El chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw) es una especie de origen Mesoamericano, cuya mayor diversidad genética esta representada especialmente en México. En nuestro país, el chayote es importante económicamente, como fuente de alimento y por su empleo en la medicina tradicional (Cadena et al., 2007), de ahí la importancia de estudiar al chayote como una especie con potencial valor nutracéutico.

En este sentido, como un intento de explicar algunos efectos medicinales de *S. edule* recientemente se han realizado estudios farmacológicos a partir de extractos acuosos, metanólicos y etanólicos de chayote. Los antecedentes muestran la presencia de compuestos como fenoles, flavonoides, alcaloides, saponinas, esteroides y terpenos que también se han aislado de otras plantas y que además en estos estudios se han caracterizado por poseer propiedades anticancerígenas (Yen et al., 2001, Salama et al., 1986 y 1987, Huang et al., 2004, Siliciano et al., 2004 y Cadena et al., 2007), lo cual; abre la posibilidad de tomar en cuenta a este producto de origen natural como una alternativa al tratamiento de enfermedades de tipo oncológicas.

A pesar de que los solventes alcohólicos son ampliamente utilizados como diluyentes de extractos de plantas al poseer características de solubilidad óptimas para la extracción inicial y para la preparación de los mismos (Colegate, *et al.*, 1993), también; se han descrito algunos inconvenientes producidos por el uso de estos solventes como la toxicidad de algunos de ellos como la del metanol. Se ha identificado al ácido fórmico, un metabolito del metanol; como el responsable de los efectos tóxicos de esta sustancia, la cual; induce daño celular y finalmente causa la muerte (Bhushan et al., 2007). En conjunto, la información anterior puede explicar de alguna manera los resultados obtenidos en este trabajo, ya que; células tumorales L929 y CasKy (carcinoma de cérvix) tratadas con la solución vehículo a base de metanol (SDM), mostraron un decremento en el número celular debido probablemente a la citotóxicidad del metanol hacia las células, incluso a partir de volúmenes medios, lo cual; descarta a esta solución como diluyente en la preparación de los extractos, aún que el metanol haya sido empleado en la obtención de uno de ellos, pues tal actividad biológica interfiere con la actividad a evaluar que es de nuestro interés.



Por otro lado, estudios epidemiológicos han mostrado consistentemente que una dieta alta en frutas, vegetales y granos; está fuertemente asociada con bajos riesgos de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer dada la presencia de fitoquímicos, tales como; compuestos fenólicos, carotenoides, alcaloides, compuestos nitrogenados y compuestos organosulfuros (Liu, 2004, Block et al., 1992 y Vinson, 2001).

En este sentido, investigaciones previas han sugerido que extractos acuosos de fruto de chayote presentan algunos compuestos con propiedades antioxidantes (Diré et al., 2001, 2002, 2003 a y b y 2004), los cuales; podrían ser flavonoides poliglucosidos, catequinas, antocianinas y dihidroflavonoles que son altamente solubles en agua (Domínguez, 1973), sin embargo; nuestros datos muestran que el extracto acuoso no presenta ninguna actividad biológica tanto en L929 como en HeLa, aún en las dosis más altas. Lo anterior, podría ser consecuencia de que el agua es poco selectiva para extraer compuestos particulares dado sus características de solubilidad, por lo que; posiblemente las concentraciones de los compuestos extraídos fueron muy bajas o simplemente porque dichos compuestos no tienen actividad biológica alguna. Además, es bien conocido que los extractos acuosos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados y deben ser obtenidos para ser utilizados en un periodo de tiempo relativamente corto (Kuklinski, 2003 y Cannell, 1993). Lo anterior, invita a realizar más determinaciones con el fin de confirmar o descartar su inactividad. De confirmarse alguna actividad biológica para el extracto acuoso, es por de más interesante; pues al ser el chayote un producto empleado como fuente de alimento, un extracto acuoso sería óptimo para aplicaciones farmacológicas futuras por su estado natural.

Por otra parte, algunos trabajos han mostrado que extractos metanólicos también obtenidos del fruto de chayote; están caracterizados por la presencia de alcaloides, saponinas y flavonoides de forma escasa y esteroides y/o terpenos en mayor proporción (Salama, 1986 y Siliciano, *et al.*, 2004), sin embargo; también se ha mostrado que terpenos como las sesquiterpenlactonas y triterpenoides como cicloartanos, lupanos, ursanos, oleananos, friedelanos, dammaranos, cucurbitacinas y limonoides, los cuales han mostrado gran actividad citotóxica o antineoplásica, son medianamente solubles en metanol (Domínguez, 1973 y Setzer y Setzer, 2003). Lo anterior, podría justificar el hecho que en nuestro proyecto, el extracto metanólico mostrara medianamente un efecto antiproliferativo y citotóxico en L929 y ligeramente más bajo en HeLa.

En tanto que, para extractos etanólicos; Cadena y colaboradores en 2007 mostraron en análisis químicos la presencia abundante de cucurbitacinas. Lo anterior, es respaldado por Afifi y colaboradores en 1999 donde se indica que estos compuestos son extraídos de forma mas eficiente con diluyentes alcohólicos como etanol, lo cual; también confirma los datos obtenidos por Salama, en 1986. En cuanto a las actividades biológicas de las cucurbitacinas, se ha mostrado que son los mayores triterpenoides citotóxicos, así por ejemplo; la cucurbitacina B se ha reportado como uno de los compuestos citotóxicos mas potentes sobre células KB *in vitro*, mientras que; la cucurbitacina E ha mostrado remarcable citotoxicidad contra células tumorales de pulmón no pequeñas (NCI-H226), de melanoma (LOX IMVI), renales (A498 y CAKI-1), de pecho (BT-549) y en una variedad de líneas tumorales de próstata (Setzer y Setzer, 2003). Sin embargo, no debe descartarse que dichas actividades se deban al efecto de compuestos como saponinas y flavonoides que también son extraídos con etanol.

Lo anterior, se corrobora ya que solventes orgánicos como el metanol y etanol presentan propiedades de polaridades semejantes, dadas los valores de su constante dieléctrica medida a 25°, siendo de 24.3 para el etanol y de 32.6 para el metanol. Lo anterior, indica que aunque el metanol es más polar que el etanol, ambos solventes orgánicos son medianamente polares con respecto al agua, la cual presenta una constante dieléctrica de 78.5 (Areal, 1995). Dadas, las propiedades de polaridad de estos solventes, se puede inferir que tienen la capacidad de extraer ciertos tipos de compuestos. La literatura, menciona que estos solventes han sido utilizados en la metodología empleada para el aislamiento e identificación de cucurbitacinas, en especies de la familia Cucurbitaceae (Cadena et al., 2007 y Afifi et al., 1999), las cuales; son compuestos de tipo triterpenoide que de manera interesante se han mostrado promisorios como agentes antineoplásicos, ya que han demostrado actividad antiproliferativa y citotóxica sobre varias líneas celulares cancerígenas, además de actividades antiinflamatorias y en general han sido reconocidas principalmente como los principios tóxicos de la familia Cucurbitaceae (Setzer y Setzer, 2003, Jayaprakasan et al., 2003).

En conjunto, estos antecedentes confirman el hecho de que el extracto etanólico probado en este estudio, ejerciera un efecto antiproliferativo y citotóxico mayor, tanto en L929 como en HeLa; comparado con el efecto de los extractos metanólico y acuoso

---

sugerido por la presencia de cucurbitacinas, lo cual de ser verdadero, sugiere un posible mecanismo de acción donde la inhibición de la proliferación celular esta dada por la interrupción de actina así se interfiere con el citoesqueleto, tal como ocurre con otras cucurbitacinas (Setzer y Setzer, 2003), aunque no se debe descartar; que los extractos de chayote presenten mecanismos de acción como los que muestran otros compuestos probablemente de la misma clase como diterpenos (taxoles), los cuales; se unen a los microtubulos, que son estructuras flexibles que participan dinámicamente en el proceso de división celular, y los convierte en estructuras estáticas, lo que impide la división celular y de esta manera mata a las células en el punto G<sub>2</sub>/M del ciclo celular (Vega et al., 2006, Balunas et al., 2005 Cragg y Newman, 2005).

Por otro lado, se ha reportado que frutas y vegetales contienen diversas clases de fitoquímicos que tienen efectos antioxidantes, antimutagénicos y anticancerígenos, haciendo a las plantas necesarias para tratar enfermedades como el cáncer, sin embargo; es poca la información sobre su potencial riesgo a la salud, dado la presencia de componentes tóxicos como el ácido oxálico, ácido nitrato y ácido erucivo, los cuales; expresan citotóxicidad y actividades genotóxicas y muestran correlación con la incidencia de tumores (Yen et al., 2001). En este sentido, aunque en este estudio no se evaluó el efecto antiproliferativo y citotóxico de los extractos de chayote sobre células normales, existen reportes que indican que extractos acuosos no inducen citotóxicidad sobre linfocitos normales humanos (Yen et al., 2001), lo cual; es muy alentador, además en conjunto, nuestros datos parecen ser prometedores ya que el descubrimiento de nuevos agentes antitumor de fuentes naturales ha sido ampliamente basado sobre la prueba de actividades citotóxicas en contra de líneas celulares cancerígenas en modelos *in vitro*, lo cual podría ser una actividad consistente con la actividad antitumor probada *in vivo* (Cragg y Newman, 2005).

También es de resaltar que aunque los extractos metanólico y etanólico, mostraron cierta selectividad en contra de L929 lo anterior confirmado por ensayos de saturación celular. Éste concepto de selectividad, sugiere la presencia de un receptor específico a la célula que diferencia una línea tumoral de otra. Tal descubrimiento podría ser de monumental importancia en términos de estrategias terapéuticas específicas (López et al., 2002), si tomamos en cuenta que matar o remover físicamente las células cancerosas en el paciente con radiación y/o químicos tóxicos o por cirugía generalmente produce

efectos secundarios como la toxicidad asociada a la pérdida de especificidad y a la resistencia tumoral (Trosko, 2003 y Srivastava et al., 2005). Alternativamente, la diferencia en susceptibilidad de L929 y HeLa podría resultar del metabolismo diferente entre estas líneas celulares, además de que la reducción del número celular y viabilidad celular para ambas líneas podría ser debido a compuestos con actividad antiproliferativa y citotóxica presentes en los extractos, esto es reforzado por la liberación de LDH implicando una muerte de tipo necrótica (López et al., 2002).

## CONCLUSIÓN

El extracto etanólico de chayote *Sechium edule* (Jaq.)Sw) var. *nigrum spinozum*, presenta el mayor efecto antiproliferativo y citotóxico, en las líneas celulares tumorales L929, seguido del extracto metanólico, mientras que el extracto acuoso no afectó la proliferación celular y tampoco tiene efecto citotóxico.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

Abdelnour, A., Ramírez, C., y Engelmann, F. (2002). Micropropagación de chayote (*Sechium edule* Jacq. SW.) a partir de brotes vegetativos. *Agron Meso.* 13(2):147-151

Afifi, M. S., Ross, S. A., Sohly, M. A., Naeem, Z. E., and Halaweish, F. T. (1999). Cucurbitacins of *Cucumis prophetarum* and *Cucumis prophetarum*. *J Chem Ecol.* 25(4):847-859

Alvarenga, V. S., Abdelnour, E. A. y Villalobos, A. V. (2007). Conservación *In Vitro* de chayote (*Sechium edule*). *Agron Meso.* 18(1): 65-73

Areal, G. R. (1995). Química orgánica aplicada I. UPC. España. Vol. 2. pp.797

American Type Culture Collection. The Global Bioresource Center. Cell lines. Protocolos de cultivo celular CasKi, HeLa y L929. [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

Balunas, J. M., and Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* (78):431–441

Balunas, J. M., Jones, P. W., Chin, Y. W., Mi, Q., Farnsworth, N. R., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Swanson, S. M., Pezzuto, J. M., Chai, H. B., and Kinghorn, A. D. (2006). Relationships between Inhibitory Activity against a Cancer Cell Line Panel: Profiles of Plants Collected, and Compound Classes Isolated in an Anticancer Drug Discovery Project. *Chem Biodiversity.* 3:897-915

Bhushan, M. K., Vandenbroucke, A. C., Adamchik, Y., Lehotay, D. C., and Carlen, P. L. (2007). Formic Acid, a Novel Metabolite of Chronic Ethanol Abuse, Causes Neurotoxicity, Which Is Prevented by Folic Acid. *Alcohol Clin Exp Res.* 31(12): 2114–2120

Block, G., Patterson, B. and Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer.* (18):1–29

- Boletín de Estadísticas Vitales. (2006). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. 52 pp
- Cadena, I. J., Arévalo, G. L., Avendaño, A. C., Soto, H. M., Ruiz, P. L., Santiago, O. E., Acosta, R. M., Cisneros, S. V., Aguirre, M. J. and Ochoa, M. D. (2007). Production, Genetics, Postharvest Management and Pharmacological Characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fresh Produce. (1): 41-53
- Cannell, R. J. (1993). Methods in Biotechnology: Natural Products Isolation. Humana Press Inc. Totowa, NJ . Vol. 4. pp. 335
- Chu, Y. F., Sun, J., Wu, X. and Liu, R. H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of vegetables. J Agric Food Chem. (50):6910–6916
- Colegate, S. M. and Molyneux, R. J. (1993). Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. Boca Raton. CRC Press. pp. 201
- Cragg, M. G. and Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. (100):72-79
- Diré, G., Lima, E., Mattos, D., Oliveira, M. B., Pereira, M. J., Moreno, S., Freitas, R., Gomes, M. L. and Bernardo, F. M. (2001). Effect of chayotte (*Sechium edule*) extract on the biodistribution of technetium-99m and on the morphometry of red blood cells. J Labelled Cpd Radiopharm. (44):648-650
- Diré, G., Lima, E. A. C., Pereira, M. J. S., Oliveira, M. B. N., Moreno, S. R. F., Mattos, D. M. M., Jales, R. L y Bernardo, F. M. (2002). Effect of a chayotte (*Sechium edule*) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m: *in vitro* and *in vivo* studies. Cell Mol Biol. (48):751-755
- Diré, G., Lima, E., Gomes, M. y Bernardo, F. M. (2003 a). The Effect of a Chayotte (*Sechium edule*) Extracts (Decoct and Macerated) on the Labeling of Blood Elements with Technetium-99m and on the Biodistribution of the Radiopharmaceutical Sodium Pertechnetate in Mice: an *In vitro* and *In vivo* Analysis. Pakistan J Nutr. 2(4):221-227

Diré, G. F., Lima, E. A. C., Gomes, M. L., Moreno, S., Faria, M. V. C., Jales, R. L., Catanho, M. T. J. A y Bernardo, F. M. (2003 b). Evaluation of the Biological Effects of a Natural Extract of Chayotte (*Sechium edule*): A Molecular and Cellular Analysis. *Pakistan J Nutr* 4(2):249-253

Diré, G., Gomes, M. L., Lima, E. A. C., Jales, R. L, Castro, F. M. y Bernardo, F. M. (2004). Effect of Chayotte Extract on the Biochemical Determinations and on Molecular and Cellular Levels. *J Biol Sci.* 4(2):146-150

Domínguez, X. A. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. México. pp 281

Gillies, R. G., Didier, N., and Dentosn, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 159(1):109-113

Gutiérrez, J. B., y Salsamendi, A. L. (2001). *Fundamentos de ciência toxicológica*. Diaz de Santos. España. pp.155–177

Huang, H. Y., Chang, C. K., Tso, T. K., Huang, J. J., Chang, W. W. y Tsai, Y. C. (2004). Antioxidant activities of various fruits and vegetables produced in Taiwan. *Int J Food Sci Nutr.* 55(5):423-429

Jayaprakasam, B., Seeram, N. P., and Nair, M. G., (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacinas from *Cucurbita andreana*. *Cancer Letters.* (18):911-16

Kuklinski, F. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal*. Omega. México. pp.388

Kueng, W., Silber, E., and Eppenberger, U. (1989). Quantification of Cells Cultured on 96-Well Plates. *Anal Biochem.* (182):16-19

Lira, S. R. (1996). Chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Italy. pp. 58



Lira, R., Castrejon, J., Zamudio, S. y Rojas, Z. C. (1999). Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. Acta Botánica Mexicana. (49):47-61

Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. Supplement J Nutr. 3479S-3485S

López, M. R., Gutiérrez, G., Mendoza, C. Ventura, J. L. Sánchez, L., Reyes, M. E., Zentella A., and Montano, L. F. (2002). Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. (293):1028–1036

Marc Lacroix, M. (2008). Persistent use of “false” cell lines. Int. J. Cancer: (122): 1–4

Masters, J. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nature reviews. (2): 315-319

Morgan, S. J. y Darling, D. C. (1993). Cultivo de células animales. Acriba. España. pp 159

Oliveira, P. A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes, P. H., De la Cruz, L. F. and López, C. (2007). Chemical carcinogenesis. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 79(4):593-616

Pardo, F. J. (1998). Anatomía, patología general y especial de las neoplasias. Científico-Médica. España. pp.355

Salama, M. A., Polo, N. A. E., Contreras, M. C. R y Maldonado, R. L. (1986). Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades anti-inflamatoria y cardiaca de *Sechium edule*. 79-82

Salama, M. A., Achebach, H., Sánchez, L. M. y Gutiérrez, G. M. (1987). Aislamiento e identificación de glucósidos antiinflamatorios de los frutos de *Sechium edule*. 15-16

Salas, M. B y Torres, M. A. (2007). Efecto de extractos de diferentes variedades de chayote *Sechium edule* en la proliferación de diferentes líneas tumorales. Reporte de servicio social. Carrera de Biología, FES-Zaragoza, UNAM. pp. 24

Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. y Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 18(9): 567-79

Seong, C. B., Hyun, H. S., Hwi, Y. Y. and Sang, H. J. (2007). Facile Synthesis of Trisaccharide Moiety Corresponding to Antitumor Activity in Triterpenoid Saponins Isolated from *Pullsatilla* Roots. *Chem Pharm Bull.* 55(12):1734-1739

Setzer, W. N and Setzer M. C. (2003). Plant-Derived Triperoids as Potential Antineoplastic Agents. *Mini Reviews in Med Chem.* (3):540-556

Siciliano, T., De Tomás, N., Morelli, I. and Braca, A. (2004). Study of Flavonoids of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz (Cucurbitaceae) Different Edible Organs by Liquid Chromatography Photodiode Array Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* (52):6510-6515

Srivastava, V., Singh, A. N., Kumar, J. K., Gupta M. M., and Suman, P. S. (2005). Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem.* (13):5892–5908

Sun, J., Dai, Z., Zhao, Y. y Chen, G. Q. (2007). In vitro effect of oligo-hydroxyalkanoates on the growth of mouse fibroblast cell line L929. *Biomaterials.* (28):3896-3903

The Local Food-Nutraceuticals Consortium. (2005). Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacol Res.* (52): 353–366

Trosko, J. E. (2003). The Role of Stem Cells and Gap Junctional Intercellular Communication in Carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 36(1):43-48

Vega, A. E., Velasco, L. R., y Jiménez, E. M. (2006). Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Bioquímica.* 31(3):97-111

Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L., and Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem.* (49):5315–5321.

Wakelin, L. P. G., Adams, A., Hunter, C. and Waring, J. (1981). Interaction of crystal violet with nucleic acids. *American Chemical Society.* 20(20):2779-5787

Yen, G.C., Chen, H. Y. y Peng, H. H. (2001). Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem Toxi.* (39):1045–1053

---

## APÉNDICE

### I. Materiales

#### A) Obtención de extractos de chayote

##### Material vegetal

Se utilizó el fruto de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. var. *nigrum spinosum*, proveniente del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* en México (BANGESe), GISeM, A.C.-CRUO-UACH; cuya colecta original se realizó el 15 de diciembre de 2005, en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México. El ejemplar herborizado se depositó en el Herbario Ortorio del Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco; México.

##### Obtención de extractos

Se prepararon tres extractos de *S. edule* con diferentes disolventes orgánicos. La extracción se realizó adaptando la metodología propuesta por Che *et al.* (1985), y Afifi *et al.* (1999), la cual consistió en cortar en trozos pequeños la muestra de frutos frescos. La muestra procesada incluyó siempre la epidermis, espinas y semilla. El tejido picado se secó a 50 °C, con circulación de aire para su maceración. Se empleó 1 Kg de fruto seco para cada extracto.

**Extracto etanólico y metanólico:** El fruto seco se mezcló con etanol al 96 % o metanol y se dejaron reposar por 72 horas con 7 y 12 cambios de disolventes respectivamente, posteriormente se licuaron finamente, colaron y exprimieron con tela de algodón para formar el extracto alcohólico. De éste, se obtuvo un extracto etéreo a través de la evaporación del disolvente en un rotavapor (BUCHI R-114) a 45 °C.

**Extracto acuoso:** A partir del fruto seco se realizó una infusión y se liofilizó por alrededor de 5 días para su secado.

### II. Cultivo celular

#### A) Preparación de medio de cultivo IMDM

17.7g de medio de cultivo IMDM y 3.024 g de NaHCO<sub>3</sub> se mezclan en 1L de agua bidestilada. La solución preparada se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore, USA). Finalmente se adicionan 1 mL de una solución de antibióticos de ampicilina-estreptomicina. El medio de cultivo IMDM, se conserva en refrigeración a 4° C.

#### B) Inactivación de SFB

El SFB se descongela a temperatura ambiente y se somete a una temperatura de 56°C durante 30 min. en un baño de agua con el propósito de inactivar proteínas del complemento. El SFB es conservado en refrigeración a -20°C.

**C) Preparación de verseno**

3.04 g de Tris base, 8 g de NaCl, 0.4 g de KCl y 0.4 g de EDTA se disuelven en 1L de agua bidestilada. La solución se ajusta a pH 7.7 con HCl 1N y se esteriliza en autoclave durante 15 min. Finalmente, la solución de verseno se conserva en refrigeración a 4°C .

**III. Soluciones diluyentes para los extractos****A) Preparación de PBS**

8 g de NaCl, 2.16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.2 g de KCl se disuelven en 1L de agua bidestilada. La solución se ajusta a pH 7.2 con HCl 1N y se esteriliza. Finalmente, la solución de PBS se conserva en refrigeración a 4°C .

**IV. Evaluación de la proliferación celular****A) Preparación de glutaraldehído al 1%**

A 1.57 mL de glutaraldehído (70% v/v) se le agrega 98.43 mL de agua bidestilada. La solución de glutaraldehído al 1% se conserva a temperatura ambiente.

**B) Preparación de la solución cristal violeta**

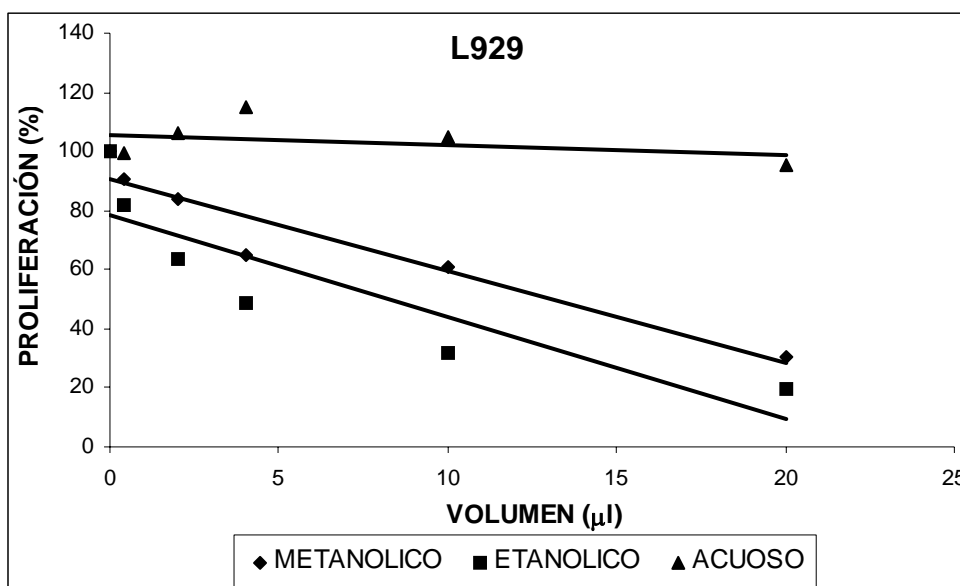
La solución cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM pH 6 que se prepara al disolver 3.96 g de NaOH en 4.28 mL de ácido fórmico. Una vez preparada esta solución, se adiciona 1 g de cristal violeta y se afora a 500 mL con agua bidestilada. Finalmente, la solución cristal violeta se filtra usando papel whatman #2 y se almacena a temperatura ambiente.

**C) Preparación de ácido acético al 10%**

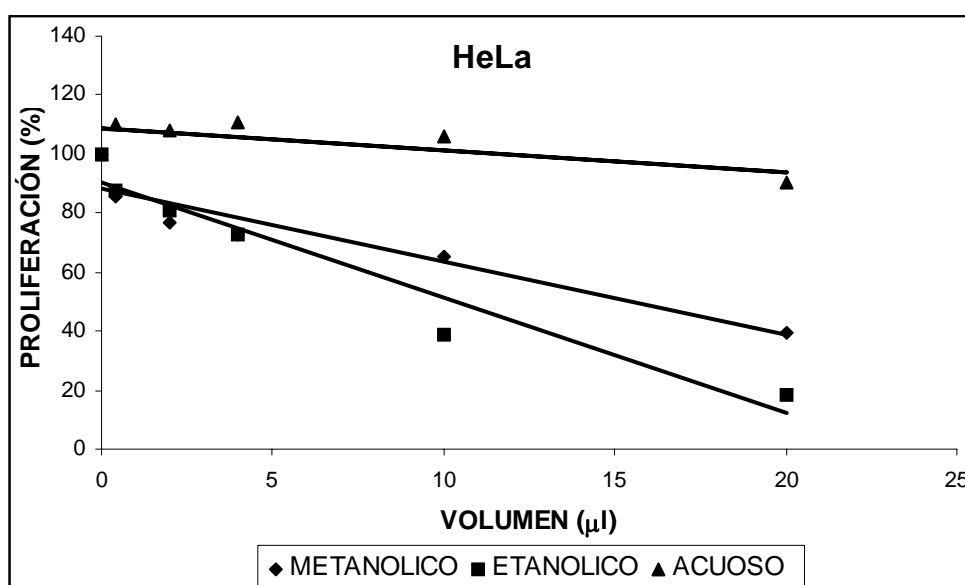
A 10 mL de ácido acético glacial se le agregan 90 mL de agua bidestilada.

V. RESULTADOS

A) Graficas de regresión lineal para obtener IC<sub>50</sub>

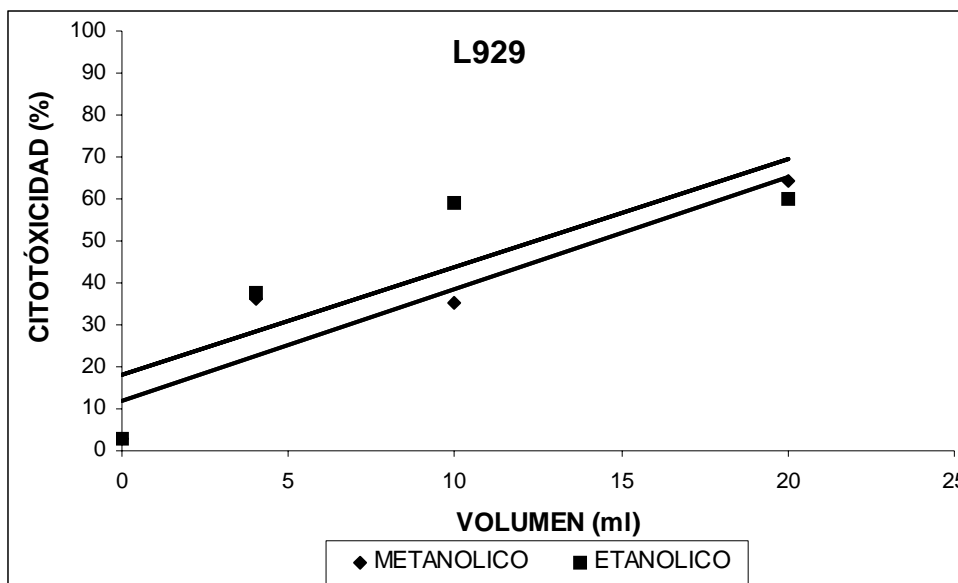


Extracto	Ecuación	IC <sub>50</sub> (μl)
Metanólico	$y = -3.1321x + 90.858$ $R^2 = 0.9178$	13.04
Etanólico	$y = -3.437x + 78.48$ $R^2 = 0.7711$	8.28
Acuoso	$y = -0.3302x + 105.5$ $R^2 = 0.138$	168.07

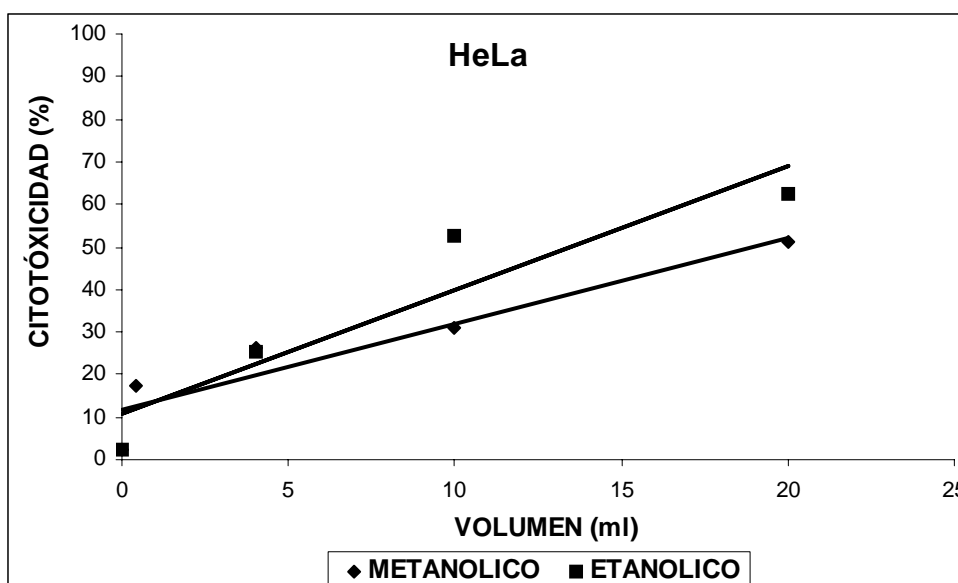


Extracto	Ecuación	IC <sub>50</sub> (μl)
Metanólico	$y=-2.5008x+88.552$ $R^2=0.895$	15.41
Etanólico	$y=-3.9059x+90.228$ $R^2=0.94$	10.29
Acuoso	$y=-0.7656x+108.85$ $R^2=0.556$	76.86

**B) Graficas de regresión lineal para obtener CC<sub>50</sub>**



Extracto	Ecuación	CC <sub>50</sub> (μl)
Metanólico	$y=2.667x+12.048$ $R^2=0.8512$	14.23
Etanólico	$y=2.5666x+17.978$ $R^2=0.7$	12.47



---

Extracto	Ecuación	CC <sub>50</sub> (μl)
Metanólico	$y=2.0188x+11.703$ $R^2=0.8824$	18.97
Etanólico	$y=2.9101x+10.893$ $R^2=0.888$	13.43